

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Fabiana Kalyne Ludka

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O EFEITO
NEUROPROTETOR E ANTIDEPRESSIVO DA
ATORVASTATINA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dra. Carla I. Tasca

Coorientadora: Prof^a. Dra. Ana Lúcia
Severo Rodrigues.

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

L944a Ludka, Fabiana Kalyne
Avaliação da associação entre o efeito neuroprotetor e
antidepressivo da atorvastatina em camundongos [dissertação] /
Fabiana Kalyne Ludka ; orientadora, Carla Inês Tasca. -
Florianópolis, SC, 2012.
95 p.: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Agentes Neuroprotetores. 3.
Antidepressivos. I. Tasca, Carla Inês. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Neurociências. III. Título.

CDU 612.82

Dedico este trabalho aos meus pais
Orestes e Salete, e a minha irmã
Flávia. Pelo amor, carinho e dedicação
de uma vida inteira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a professora orientadora Dra. Carla I. Tasca, pela oportunidade, pela ajuda incondicional, por todos os ensinamentos e experiência repassada, pela paciência e pela enorme dedicação e confiança com que me mostrou o melhor caminho para a execução deste trabalho. Recebi nobres ensinamentos de uma nobre professora. Fica aqui o meu muito obrigada e a minha admiração;

Aos professores do colegiado do PPG Neurociências, em especial a professora co-orientadora Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela paciência e principalmente pela ajuda na execução deste trabalho;

A minha sempre orientadora e amiga Dra. Simone Molz. Obrigada por ter me ensinado o que é pesquisa e o que é ser pesquisador. Obrigada por abrir as portas desse mundo tão instigante e por ser o exemplo de pesquisadora que me fez almejar seguir avidamente por este caminho;

As pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe, Salete Adur Ludka pela disposição, pelos ensinamentos, pela companhia e pelo amor inesgotável; ao meu pai Orestes Silvio Ludka que sempre acreditou no meu sucesso e sabiamente soube me guiar e incentivar a tomar decisões certas; e a minha irmã Flávia Rafaela Ludka, pela companhia agradável, por ser cúmplice da minha jornada e acima de tudo por me apoiar, ajudar e ser minha amiga. Ao meu namorado e antes de tudo amigo, Paulo D. Serpa Bonatto pela paciência e compreensão, sendo que mesmo muitas vezes estando longe se fez presente;

Aos meus familiares, e amigos muito obrigada! Robson e Gisela Adur obrigada por tudo. A concretização desse sonho e a minha realização pessoal só foram possíveis com o apoio e a colaboração mútua de vocês;

A minha amiga e companheira de apartamento Gislaine Kuminek. Obrigada pela companhia, por toda a ajuda, pelo incentivo, pelas horas de conversas intermináveis e por compartilhar comigo as dúvidas e angústias dessa vida acadêmica!

A todos os pesquisadores do Laboratório de Neuroquímica 4, em especial a minha amiga Leandra Celso Constantino. Muitos foram os experimentos, as conversas, os seminários, e as experiências trocadas. Muito, muito obrigada pela tua companhia e tua amizade! A Tharine Dal-Cim, pela ajuda e pelos ensinamentos repassados. A Ana Lúcia Zeni, pela ajuda na realização dos experimentos iniciais, e pela troca de experiências. A Luisa Biinder por toda ajuda e disponibilidade.

Aos pesquisadores do Laboratório de Neurobiologia da depressão, em especial a Andréa D. E. Zomkowski, pela disponibilidade em ajudar na execução deste trabalho, pelos grandes momentos de convívio e por todos os ensinamentos repassados;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa com bolsa auxílio;

Aos animais experimentais. Obrigada por terem sido a ferramenta para o meu aperfeiçoamento;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

*Gosto daquilo que me desafia.
O fácil nunca me interessou.
Já o obviamente impossível sempre me atraiu e
muito.*

(Clarisse Lispector)

RESUMO

A excitotoxicidade glutamatérgica têm sido correlacionada com a patofisiologia da depressão e a modulação deste sistema vem sendo abordada como uma potencial estratégia no tratamento deste transtorno de humor. A atorvastatina é uma estatina sintética e lipofílica que apresenta um efeito satisfatório na diminuição dos níveis de colesterol, é segura e bem tolerada. Estudo com humanos sugerem uma correlação positiva entre o uso de estatinas e a diminuição do risco de depressão. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito tipo antidepressivo da administração de atorvastatina a camundongos, a participação da via L-arginina-NO-GCs-GMPc neste efeito e a correlação entre o efeito antidepressivo e neuroprotetor frente à toxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo e córtex cerebral. Demonstrou-se a participação dos receptores NMDA e da via de sinalização L-arginina-NO-GCs-GMPc no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina no Teste de Suspensão pela Cauda (TSC). A administração aguda de atorvastatina (p.o.) reduziu o tempo de imobilidade no Teste do Nada Forçado (TNF) e no TSC (0,1-30 mg/kg), sem alterar a atividade locomotora dos animais. O efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina (0,1mg/kg) foi prevenido pela administração de NMDA (0,1 pmol/ sítio, i.c.v.), L-arginina (750mg/kg, i.p., substrato da ONS) ou sildenafil (5mg/kg, i.p., um inibidor da PDE5). A administração de MK-801 (0,001mg/kg, i.p., um antagonista do receptor NMDA), 7-nitroindazol (50mg/kg, i.p., inibidor da NOSn) ou ODQ (30pmol/ sítio, i.c.v., inibidor da GCs) em combinação com uma dose sub-efetiva de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) reduziu o tempo de imobilidade dos animais no TSC quando comparado com a administração das drogas isoladas. O tratamento agudo com atorvastatina ainda aumentou os níveis hipocámpais de uma neurotrofina, o BDNF (0,1-10,0 mg/kg, p.o.), porém não preveniu da toxicidade glutamatérgica induzida pela incubação de fatias de hipocampo e córtex com glutamato (10 mM). Em contrapartida o tratamento repetido com atorvastatina (10mg/kg, 1 vez/dia, 7 dias consecutivos), foi capaz de desencadear um efeito neuroprotetor em fatias de hipocampo, porém não de córtex frontal, submetidas a toxicidade glutamatérgica, via diminuição da liberação de glutamato induzida por glutamato. A administração repetida de fluoxetina (10 mg/kg p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos), um antidepressivo clássico, também demonstrou efeito neuroprotetor e tipo-antidepressivo similares aos decorrentes da administração repetida de atorvastatina. Estes

resultados apontam para uma associação entre o efeito neuroprotetor e antidepressivo da atorvastatina.

Palavras-chave: Atorvastatina, neuroproteção, sistema glutamatérgico, efeito tipo-antidepressivo.

ABSTRACT

Glutamate excitotoxicity has been related to the pathophysiology of depression and this system modulation has been proposed as a potential strategy for the treatment of this mood disorder. Atorvastatin is a synthetic and lipophilic statin that presents a good effect in decreasing cholesterol levels and is safe and well tolerated in humans. Population-based studies have suggested a positive role of statins in reducing depression risk. This study aimed to investigate the antidepressant-like effect of atorvastatin, the involvement of L-arginine-NO-GC-cGMP in this effect and the relationship between antidepressant-like effect and neuroprotective effect of atorvastatin in hippocampal and cortical slices subjected to glutamate toxicity. The participation of NMDA receptors and L-arginine-NO-GC-cGMP on the antidepressant-like effect was demonstrated in the tail suspension test (TST). Acute atorvastatin administration (p.o.) reduced the immobility time both in TST and in Forced Swimming Test (FST) (0.1-30 mg/Kg). Atorvastatin (0.1 mg/kg) antidepressant-like effect was prevented by pretreatment of mice with NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.), L-arginine (750 mg/kg, i.p., a substrate for NOS) or sildenafil (5 mg/kg, i.p., a PDE-5 inhibitor). The administration of MK-801 (0.001mg/Kg, i.p., an NMDA receptor antagonist), 7-nitroindazole (50 mg/kg, i.p., a nNOS inhibitor), methylene blue (20 mg/kg, i.p., an inhibitor of both NOS and sGC) or ODQ (30 pmol/site i.c.v., a sGC inhibitor) in combination with a sub-effective dose of atorvastatin (0.01 mg/kg, p.o.) reduced the immobility time in the TST as compared with drugs alone. Acute atorvastatin treatment (0.1 - 10.0 mg/kg, v.o.) also increased hippocampal BDNF expression, however did not prevent from glutamatergic toxicity induced by hippocampal and cortical slices incubation with glutamate (10 mM). On the other hand, repeated treatment with atorvastatin (10 mg/kg p.o., once a day, for 7 consecutive days) exerted neuroprotective effect in hippocampal slices, but not in cortical slices, subjected to glutamatergic toxicity, by decreasing glutamate release induced by glutamate. This neuroprotective effect could be linked to the antidepressant-like effect triggered by repeated administration of atorvastatin. Both, the neuroprotective effect and the antidepressant-effect evoked by repeated atorvastatin treatment can be compared with the neuroprotective and antidepressant-like effect of fluoxetine (10mg/kg p.o., once a day, for 7 consecutive days), a classic antidepressant. Altogether these results demonstrate an association

between the neuroprotective and the antidepressant action of atorvastatin.

Keywords: Atorvastatin, neuroprotection, glutamatergic system, antidepressant-like effect.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1	Esquema de uma sinapse excitatória.....	23
Figura 2	Via de biossíntese do colesterol.....	31
Figura 3	Estrutura química da atorvastatina, uma estatina sintética.....	32

RESULTADOS_PARTE I

Figura 1	Efeito tipo-antidepressivo decorrente da administração aguda de atorvastatina a camundongos.....	44
Figura 2	Tempo de duração do efeito da administração aguda de atorvastatina a camundongos no TSC.....	46
Figura 3	Envolvimento do receptor NMDA no efeito tipo-antidepressivo da administração aguda de atorvastatina a camundongos.....	48
Figura 4	Participação da L-arginina no efeito da administração aguda de atorvastatina a camundongos no TSC.....	49
Figura 5	Envolvimento da ONSn e da GCs no efeito tipo antidepressivo decorrente da administração aguda de atorvastatina a camundongos.....	50
Figura 6	Participação da PDE-5 no efeito tipo-antidepressivo da administração aguda de atorvastatina a camundongos.....	52
Figura 7	Efeito da administração aguda de atorvastatina a camundongos nos níveis hipocampais de BDNF.....	53

RESULTADOS_PARTE II

Figura 1	Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas a um modelo <i>in vitro</i> de toxicidade glutamatérgica.....	56
Figura 2	Avaliação do efeito neuroprotetor da administração aguda de atorvastatina a camundongos.....	57
Figura 3	Avaliação do efeito neuroprotetor da administração repetida de atorvastatina a camundongos.....	59

Figura 4	Tratamento subcrônico com atorvastatina reduz a liberação de glutamato induzida por glutamato.....	60
Figura 5	Efeito tipo-antidepressivo do tratamento subcrônico de atorvastatina em camundongos no TSC.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína cinase B
AMPA	Alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
Ca ²⁺	Íons cálcio
CaM-cinase II	Cálcio calmodulina – cinase II
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAAC1	Carreador de aminoácidos excitatórios
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatórios
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
FPP	Farnesil pirofosfato
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GDP	Guanosina di-fosfato
GGPF	Geranil geranil pirofosfato
GLAST	Transportador de glutamato/aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato 1
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HBSS	Solução tempão de Hank
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
HMG-CoA	3-hidroxi-3metilglutaril coenzima A
i.c.v.	Intracerebroventricular
iGluR	Receptore ionotrópico de glutamato
i.p.	Intraperitoneal
KA	Kainato
KRB	Krebs Ringer Bicarbonato
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MAOIs	Inibidores da monoamina oxidase
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
MK-801	Maleato de (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina
NA	Noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
MTT	Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase

NOSn	Óxido nítrico sintase neuronal
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
NOS	Óxido nítrico sintase
PDE	Fosfodiesterase
PI3K	Proteína cinase de fosfatidilinositol 3
p.o.	Por via oral
PSD 95	Proteína de densidade pós-sináptica de 95 KDaltons
TCA	Teste do campo aberto
TCAs	Antidepressivos tricíclicos
TNF	Teste do nado forçado
tPA	Ativador de plasminogênico tecidual
TrkB	Receptores tirosina cinase B
TSC	Teste de suspensão pela cauda
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
VGluTs	Transportadores vesiculares de glutamato
5-HT	Serotonina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	21
1.1.1	Excitotoxicidade.....	24
1.2	DEPRESSÃO.....	26
1.2.1	Evidências da participação do sistema glutamatérgico na patofisiologia da depressão.....	27
1.3	ESTATINAS.....	30
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	ANIMAIS.....	37
3.2	ADMINISTRAÇÃO P.O. DE ATORVASTATINA....	37
3.3	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	37
3.3.1	Teste de Suspensão pela Cauda (TSC).....	37
3.3.2	Teste do Nado Forçado (TNF).....	38
3.3.3	Teste do Campo Aberto (TCA).....	38
3.4	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS NEUROTRANSMISORES NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ATORVASTATINA <i>IN VIVO</i>	38
3.4.1	Avaliação da participação da via L-arginina-NO no efeito antidepressivo da atorvastatina.....	38
3.5	AVALIAÇÃO <i>EX VIVO</i> DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA DA ATORVASTATINA CONTRA A TOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA..	39
3.5.1	Preparação de fatias hipocampais e corticais.....	39
3.5.2	Indução da toxicidade glutamatérgica em fatias hipocampais e corticais.....	40
3.5.3	Ensaio da viabilidade celular.....	40
3.5.4	Liberação de glutamato.....	40
3.6	IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS.....	41
3.6.1	Preparação da amostra.....	41
3.6.2	Dosagem de proteínas.....	41
3.6.3	Separação de proteínas.....	41

3.6.4	Eletrotransferência e Imunodeteccção.....	42
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4	RESULTADOS.....	43
	PARTE I – Tratamento agudo com atorvastatina desencadeia efeito tipo-antidepressivo em camundongos através da modulação da via L-arginina-ON-GMPc e aumenta a expressão de BDNF.....	43
4.1	EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ATORVASTATINA EM CAMUNDONGOS.....	43
4.2	ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NMDA NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ATORVASTATINA NO TSC.....	46
4.3	ENVOLVIMENTO DA VIA L-ARGININA-NO-GMPc NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ATORVASTATINA NO TSC.....	49
4.4	TRATAMENTO AGUDO COM ATORVASTATINA AUMENTA OS NÍVEIS HIPOCAMPAIS DE BDNF EM CAMUNDONGOS..	53
	PARTE II – Tratamento subcrônico com atorvastatina previne da excitotoxicidade glutamatérgica via diminuição da liberação de glutamato e desencadeia efeito tipo-antidepressivo.....	55
4.5	EFEITO NEUROPROTETOR DA ATORVASTATINA FRENTE A TOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA EM FATIAS HIPOCAMPAIS E CORTICAIS.....	55
5	DISCUSSÃO.....	63
6	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

Um dos mais importantes sinalizadores químicos utilizados no Sistema Nervoso Central (SNC) é o aminoácido excitatório L-glutamato (Danbolt, 2001). O tecido cerebral contém uma concentração bastante elevada de glutamato, cerca de 5-15 mmol/kg. A maior parte deste glutamato é encontrada em neurônios. A concentração de glutamato no citoplasma de neurônios glutamatérgicos é de aproximadamente 5-10mM. Esta concentração é muito maior do que a concentração de qualquer outro aminoácido e muito mais abundante neste tecido do que em qualquer outro (Ottersen, Zhang, Walberg, 1992; Danbolt, 2001).

O glutamato participa de muitas reações no SNC de mamíferos, mantendo os fenômenos plásticos vinculados ao desenvolvimento, ao aprendizado e à memória e sendo considerado um mediador das emoções (Meldrum, 2000, Danbolt, 2001). Do ponto de vista metabólico, o glutamato pode ser entendido como um esqueleto carbônico, que usualmente provém da glicose que através do ciclo do ácido cítrico é convertida a α -cetoglutarato, e por sua vez recebe um grupamento amino de outro aminoácido através de uma reação de transaminação (Siegel et al., 2006).

O glutamato citoplasmático é encontrado em maiores concentrações nos terminais axonais, sendo armazenado em vesículas através dos transportadores de glutamato (VGluTs) (Takamori, 2006). Em resposta a altas concentrações de íons cálcio (Ca^{2+}), tipicamente resultantes de potenciais de ação, as vesículas fundem com a membrana plasmática, liberando o glutamato para a fenda sináptica. Uma vez na fenda sináptica, o glutamato pode difundir-se e interagir com diferentes receptores alvos localizados nas membranas pré e pós-sinápticas (Kew e Kemp, 2006).

Existem basicamente duas categorias de receptores glutamatérgicos: os receptores ionotrópicos (iGluR) – canais iônicos que se abrem com a união de glutamato - e os receptores metabotrópicos (mGluR) – que não conduzem fluxos de íons mas sim ativam enzimas intracelulares através do acoplamento a proteínas G (Kew e Kemp, 2006; Siegel et al., 2006). Receptores ionotrópicos são canais iônicos multiméricos e a união de agonistas a esses receptores leva a alteração conformacional do canal, o que aumenta a probabilidade de abertura do mesmo e acarreta em influxo de íons. As três classes de iGluR foram inicialmente nomeadas pela seletividade a seus agonistas: N-metil-D-

aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico (AMPA) e kainato (KA) (Kew e Kemp, 2006). Já os mGluR constituem-se de proteínas com sete domínios transmembrana acoplados a proteína G. Existem 8 tipos de mGluR e estes foram identificados e classificados em 3 grupos (I, II e III), baseados na homologia da sequência de aminoácidos, vias de transdução de sinais e seletividade farmacológica (Kenny e Markou, 2004). A união do glutamato aos mGluRs leva a ativação de cascatas de sinalização intracelular dependentes de proteína-G. Os mGluRs do tipo I ativam a fosfolipase C enquanto os tipos II e III são usualmente acoplados a modulação da atividade da adenilato ciclase (Conn e Pin, 1997). Os iGluRs e os mGluRs coexistem em uma mesma sinapse (Pin e Duvoisin, 1995).

Uma vez na fenda sináptica, o glutamato ativa inicialmente os receptores AMPA, levando a entrada de íons sódio para o interior do neurônio, despolarizando-o. Quando a membrana neuronal é despolarizada, e somente nessas condições, o íon magnésio que mantém o potencial de repouso do receptor NMDA é liberado, o que permite a união dos co-agonistas serina e glicina ao receptor (Hara e Snider, 2007). Dessa forma correntes iônicas ocorrem através do receptor NMDA, o que acarreta entrada de grande quantidade de Ca^{2+} extracelular para o interior da célula (Ozawa et al., 1998).

Pouca ou nenhuma conversão metabólica do glutamato é realizada a nível extracelular, o que permite que este interaja com seus receptores pós-sinápticos até que seja difundido ou retirado da fenda sináptica através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT) dependentes de sódio, que mantém os níveis fisiológicos de glutamato. Os transportadores de glutamato são responsáveis pela captação do glutamato extracelular, permitindo assim a neurotransmissão excitatória normal e protegendo da excitotoxicidade. Existem cinco tipos de EAATs que diferem quanto a localização e/ou função, e grande parte desses transportadores está presente nos astrócitos próximos às sinapses glutamatérgicas, sugerindo que o glutamato liberado nas sinapses é reciclado nos astrócitos, ou seja, convertido a glutamina, liberado no espaço extracelular, captado por neurônios e convertido novamente a glutamato (Danbolt, 2001; Featherstone, 2010). Nos roedores os EAATs são designados como transportador de glutamato/aspartato (GLAST) e transportador de glutamato-1 (GLT-1) (em humanos são designados como EAAT1 e EAAT2, respectivamente) e são considerados transportadores gliais. Transportadores neuronais também são importantes para manter as baixas concentrações extracelulares de glutamato. O transportador

neuronal de glutamato mais amplamente distribuído no cérebro é o carreador de aminoácidos excitatórios 1 (EAAC1 - homólogo humano, EAAT3), encontrado em regiões não-sinápticas (Danbolt, 2001). Uma representação da sinapse glutamatérgica está apresentada na Fig. 1.

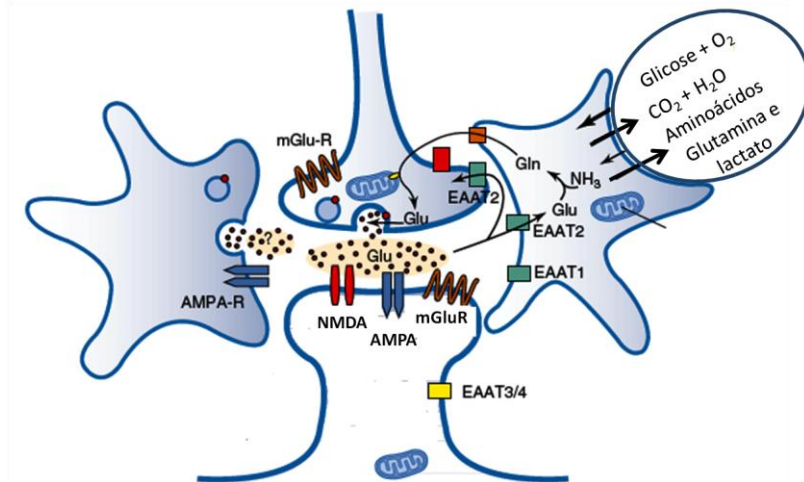


Figura 1. Esquema de uma sinapse excitatória. O neurônio pré-sináptico contém vesículas sinápticas com transportadores de glutamato (ponto vermelho), mitocôndria com glutaminase (ponto amarelo), receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu-R) e transportadores de glutamato (EAAT2) e glutamina (laranja). O neurônio pós-sináptico contém receptores iGLURs (AMPA e NMDA), mGLURs e transportadores de glutamato. Circundando a sinapse neuronal, estão os astrócitos com transportadores de glutamato (EAAT1 e EAAT2), receptores de glutamato e vesículas cheias do neurotransmissor. O glutamato que escapa da fenda sináptica sem ser captado por transportadores pode ser difundido para sinapses vizinhas (Adaptado de Siegel e colaboradores, 2006).

Apesar da importância fisiológica do glutamato, a retirada desse aminoácido da fenda sináptica é um importante mecanismo a fim de diminuir a quantidade desse neurotransmissor na fenda, prevenindo a excitotoxicidade (Phillis e O'regan, 2002).

1.1.1 Excitotoxicidade

Apesar do papel fisiológico do glutamato, seus efeitos tóxicos em certas condições são conhecidos em várias regiões do SNC desde 1960. Da relação entre os efeitos fisiológicos e tóxicos do glutamato surgiu o termo excitotoxicidade, proposto primeiramente por Olney e colaboradores em 1970 (Curtis e Watkins, 1960; Krnjevic e Phillis, 1963; Olney, 1989).

O termo excitotoxicidade refere-se à toxicidade causada pelo aumento da concentração de glutamato durante a transmissão sináptica e conseqüente morte neuronal (Meldrum 2000). A estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos pode ter inúmeros efeitos prejudiciais, como o influxo massivo de Ca^{2+} e a liberação de óxido nítrico (NO) (Lau e Tymianski, 2010).

Já foi demonstrado que o influxo de Ca^{2+} através dos receptores NMDA é essencial para a excitotoxicidade glutamatérgica (Choi, 1985), e esse íon pode atingir níveis críticos levando ao surgimento de danos e até mesmo morte celular (Szydlowska e Tymianski, 2010). Os receptores NMDA são permeáveis a Ca^{2+} permitindo que ocorra um grande aumento das concentrações desse íon no interior da célula, portanto, a hiperativação deste iGluR tem sido considerada a principal responsável pela morte celular devido à excitotoxicidade (Stone e Addae, 2002). O influxo de Ca^{2+} pode levar a ativação de cascatas tóxicas, que culminam em última instância com a morte celular. Essas cascatas incluem a ativação de enzimas catabólicas como fosfolipases, endonucleases ou proteases como a caspase e calpaína (Siegel et al., 2006). Ainda, grande parte do Ca^{2+} é sequestrado pela mitocôndria, o que acarreta em acidose metabólica, inibição da fosforilação oxidativa, formação de poros de permeabilidade transitória, colapso bioenergético e formação de radicais livres via toxicidade mitocondrial (Nichols et al., 2007; Ryter et al., 2007).

A toxicidade do Ca^{2+} via receptor NMDA, depende em parte da existência de proteínas de ancoramento como a proteína de densidade pós-sináptica (PSD-95) que permite a interação deste segundo mensageiro com enzimas intracelulares como a óxido nítrico sintase (NOS) (Sattler et al., 1999; Aarts et al., 2002). Uma vez que o receptor NMDA permite o influxo de Ca^{2+} , este interage com a calmodulina dando origem ao complexo cálcio-calmodulina (CaM-cinase II), que por sua vez ativa a NOS, que interage com a PSD-95. A NOS ativada produz NO a partir da L-arginina. Dentre múltiplos alvos a NO ativa a guanilato ciclase (GC), a enzima que catalisa a conversão de guanosina

trifosfato (GTP) ao mensageiro intracelular guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que por sua vez é degradada a GMP por ação de fosfodiesterases (PDE) (Esplugues, 2002; Siegel et al., 2006). Uma vez formado, o NO pode ainda interagir com o radical livre superóxido levando a formação de peroxinitrito, um potente oxidante, que pode causar nitratação e/ou oxidação de proteínas, peroxidação de lipídeos e dano direto ao DNA, levando a morte celular (Radi et al., 1991a; Radi et al., 1991b).

Já está estabelecido que o NO inibe também a neurogênese (Zhu et al., 2006). As neurotrofinas são proteínas que controlam a sobrevivência e diferenciação na sinaptogênese e apresentam um importante papel na plasticidade sináptica no SNC (Carvalho et al., 2008). O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é sintetizado como uma pré-pró-neurotrofina, em muitas regiões do encéfalo como o hipocampo e o córtex cerebral (Zhou et al., 2004) e precisa passar por modificações pós-translacionais antes de ser transformada a uma proteína homodimérica madura. Os níveis e a secreção de BDNF podem ser regulados por atividade neuronal, e este co-localiza com um receptor da família dos receptores de tirosina cinase, o TrkB, nas sinapses glutamatérgicas (Matsumoto et al. 2006). Existe ampla evidência de que o BDNF influencia a formação, a estabilidade e a morfologia das sinapses excitatórias, provavelmente por mecanismos pré-sinápticos e pós-sinápticos (Wu et al., 1996; Gomes et al., 2006), como também participa da plasticidade sináptica, e está envolvido nos fenômenos de aprendizado e memória (Koponen et al., 2004). Uma depleção nos níveis hipocampais de BDNF pode acarretar em déficits cognitivos e comprometer a extinção de memórias aversivas (Heldt et al., 2007).

Muitas doenças neurodegenerativas apresentam a excitotoxicidade como um evento que acompanha o aparecimento e/ou o curso da doença. Já foi relatado que o evento excitotóxico é comum na isquemia cerebral (Jorgensen e Diemer, 1982; Tymianski, 2011), no trauma encefálico (Faden et al., 1989; Baker et al., 1993; Koura et al., 1998) em várias doenças neurodegenerativas como nas enfermidades de Parkinson (Boll et al., 2011; Chen et al., 2011) e Alzheimer (Cassano et al., 2011) e também em doenças neuropsiquiátricas como o transtorno bipolar (Ginsberg et al., 2011), a esquizofrenia (Moghaddam e Javitt 2012) e a depressão (Sanacora, 2008).

1.2 DEPRESSÃO

A depressão é um transtorno grave e debilitante que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. É caracterizada por permanente tristeza, anedonia, culpa, baixa auto-estima, distúrbios do sono, falta de concentração e pensamentos suicidas. A Organização Mundial da Saúde elegeu a depressão maior como a quarta causa de incapacidade em 1990 e acredita que em 2020, este transtorno de humor seja o segundo causador de incapacidades em todo o mundo (Murray e Lopez, 1996). Pacientes acometidos por depressão maior ou transtorno bipolar apresentam uma taxa de suicídio em torno de 15%, de forma que estes transtornos promovem sofrimento incalculável, prejuízos funcionais que limitam a vida social do paciente e acarretam altos custos financeiros (Picchini et al., 2004; McIntyre et al., 2006; Prince et al., 2007).

Regiões do encéfalo como o córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior, complexo amigdalóide, giro parahipocampal e hipocampo estão envolvidas no processamento da emoção e na integração desta com a cognição e as funções viscerais (Frangou, 2006). A depressão está associada a alterações morfológicas dessas regiões, como atrofia, vulnerabilidade seletiva à morte celular de neurônios regionais, alterações neuroquímicas, mudanças na sinalização intracelular e na expressão gênica (Tsankova et al., 2007).

A patofisiologia da depressão envolve fatores genéticos e ambientais que contribuem para a vulnerabilidade de um indivíduo ao desenvolvimento da depressão (Ansorge et al., 2007), de forma que a etiologia e a neurobiologia deste transtorno ainda não se encontra totalmente elucidada (Shaltiel et al., 2007), o que dificulta o desenvolvimento de tratamentos efetivos.

A observação de que os sintomas clínicos dos pacientes com depressão são influenciados com a manipulação farmacológica do sistema monoaminérgico trouxe a hipótese de que a depressão resulta de uma deficiência funcional ou quantitativa das monoaminas, em especial da serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) em regiões cerebrais (Schildkraut, 1965; Coppen, 1967). A ação de antidepressivos tricíclicos (TCAs) e inibidores da monoamina oxidase (MAOIs), eficazes em aumentar os níveis das monoaminas e o fato de drogas como a reserpina induzirem depressão, suportaram por mais de meio século a hipótese monoaminérgica da depressão, e apoiados nesta teoria os antidepressivos comumente utilizados na clínica foram desenvolvidos (Ordway et al., 1999).

A hipótese monoaminérgica, por si só não pode explicar a neuropsicofarmacologia da depressão, nem tão pouco o mecanismo de ação dos antidepressivos clássicos (Sanacora et al., 2012), e algumas inconsistências nesta teoria tem sido apontadas. Os antidepressivos utilizados na clínica aumentam os níveis das monoaminas em minutos ou horas, enquanto o efeito terapêutico só é observado depois de algumas semanas (Racagni e Popoli, 2008). Em concordância, apenas cerca de 50-60% dos pacientes com depressão atingem a remissão dos sintomas clínicos com o primeiro antidepressivo clássico utilizado (Trivedi et al., 2006). Ainda, o fato de que nem todas as drogas que aumentam os níveis de monoaminas são necessariamente efetivas no tratamento da depressão dá consistência à idéia da necessidade de outros sistemas neurotransmissores envolvidos tanto na neurobiologia da depressão, quanto no mecanismo de ação dos antidepressivos (Lanni et al., 2009).

Fica claro, que apesar das limitações, a hipótese monoaminérgica tem sido de grande importância no entendimento da depressão e no desenvolvimento de estratégias farmacológicas efetivas e seguras. Porém, já foi demonstrado que as monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) afetam a expressão, a fosforilação e o tráfego de iGLURs e, além disso, apesar dos antidepressivos clássicos atuarem através do aumento rápido dos níveis das monoaminas, parece que esta classe de medicamentos converge em última instância para a regulação da plasticidade sináptica e do processo de informações mediados por receptores AMPA e NMDA (Sanacora et al., 2008). Além disso, vale ressaltar que enquanto os níveis de monoaminas no SNC existem em uma concentração de $\mu\text{mol/kg}$, a concentração de glutamato no SNC é da ordem de mmol/kg (Kugaya e Sanacora, 2005), a vasta maioria das sinapses é glutamatérgica e estas medeiam a cognição e a emoção (Pessoa, 2008) perturbadas em pacientes com depressão. Juntas estas observações sugerem que além do papel do sistema monoaminérgico na patofisiologia e tratamento da depressão, outros sistemas desempenham um papel fundamental, e o sistema glutamatérgico parece ser crucial para o entendimento e tratamento deste transtorno do humor (Sanacora et al., 2012).

1.1.1 Evidências da participação do sistema glutamatérgico na patofisiologia da depressão

O papel do sistema glutamatérgico na patofisiologia e no tratamento da depressão tem sido investigado, e evidências sugerem que

a atividade anormal desse sistema parece contribuir com alterações sinápticas e influenciar a plasticidade neuronal que é observada em pacientes com depressão (Kugaya e Sanacora, 2005; Sanacora et al., 2008; Lanni et al., 2009; Sanacora et al., 2012).

Estudos *post mortem* demonstraram níveis aumentados de glutamato no plasma (Altamura et al., 1993; Mauri et al., 1998), no fluido cerebrospinal (Levine et al., 2000; Frye et al., 2006) e no tecido cerebral (Francis et al., 1989) de indivíduos com transtornos do humor. Sanacora e colaboradores (2004) demonstraram um aumento nos níveis de glutamato em córtex occipital de cerca de 15%, em pacientes com depressão unipolar não medicados quando comparados com pacientes controles saudáveis. Em contrapartida, Maes e colaboradores (1998) não encontraram diferenças nos níveis plasmáticos de glutamato em indivíduos com ou sem depressão, porém observaram uma diminuição desses níveis após o tratamento por cinco semanas com antidepressivos clássicos, o que foi confirmado por estudos subsequentes (Küçükibrahimoğlu et al., 2009).

Os receptores NMDA tem importância central em muitas mudanças na conectividade das sinapses e quando cronicamente e intensamente estimulados podem desencadear morte celular (Kugaya e Sanacora, 2005). Estudos tem demonstrado alterações relacionadas a expressão e a afinidade deste receptor, entre indivíduos com ou sem transtornos do humor (Sanacora et al., 2008). Uma diminuição significativa na densidade no sítio de união de glicina dos receptores NMDA foi relatada em pacientes com depressão maior e depressão bipolar (Nudmamud-Thanoi e Reynolds, 2004). Um aumento de 61% na subunidade NR2C do receptor NMDA no locus ceruleus em pacientes com depressão também foi descrito. Além de anormalidades na expressão de receptores NMDA (Karolewicz et al., 2005) e AMPA (Meador-Woodruff et al., 2001) já foi demonstrado que a expressão dos EAATs e da enzima glutamina sintetase está reduzida no córtex pré-frontal e córtex cingulado anterior de indivíduos com depressão maior, sugerindo que alterações gliais estão associadas a danos na captação e metabolismo do glutamato (Choudary et al., 2005) o que altera o ciclo glutamato/glutamina (Miguel-Hidalgo et al., 2010).

Estudos pré-clínicos têm demonstrado que medicamentos que afetam o sistema glutamatérgico, podem desencadear um efeito antidepressivo, tanto em animais (Panconi et al., 1993; Ossowska et al., 1997; Rosa et al., 2003; Chaki et al., 2004; Yilmaz et al., 2011), como em humanos (Li et al., 2010). Antagonistas não-competitivos do NMDA como a memantina e a amantadina, já demonstraram efeitos

antidepressivos em estudos prévios com humanos (Görtelmeyer e Erbler, 1992; Ferszt et al., 1999). A administração de uma única dose de ketamina, outro antagonista não competitivo do NMDA, foi capaz de desencadear um efeito antidepressivo sustentado por pelo menos alguns dias (Berman et al., 2000; Kudoh et al., 2002; Diazgranados et al., 2010, Valentine et al., 2011). A lamotrigina, um agente que diminui a liberação excessiva de glutamato através da inibição de canais dependentes de sódio, de cálcio e de potássio, também se mostrou efetiva no tratamento da depressão bipolar (Hurley, 2002; Bowden et al., 2003). Outro agente modulador do sistema glutamatérgico, o riluzole, que suprime a condução pré-sináptica dos neurônios glutamatérgicos e modula a captação e a liberação de glutamato pelos astrócitos, tem sido demonstrado como monoterapia eficaz no tratamento da depressão refratária e da depressão bipolar (Sanacora et al., 2004; Zarate et al., 2004).

O envolvimento da via dependente da ativação de NMDA, L-arginina-NO-GMPc, tem sido extensivamente explorada na depressão. Diversos antidepressivos como a venlafaxina (inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina), bupropiona (inibidor da recaptação de dopamina) e a memantina (antagonista do receptor NMDA) modulam esta via de sinalização (Dhir e Kulkarni, 2011). Um aumento nos níveis de GMPc pode produzir um estado tipo-depressivo, enquanto a diminuição desses níveis acarretam em efeito tipo-antidepressivo (Heiberg et al., 2002). Ainda, muitos trabalhos têm demonstrado que a inibição da NOS e/ou da guanilato ciclase solúvel (GCs) podem, dependendo da dose, promover um efeito tipo-antidepressivo (Kaster et al., 2005; Zomkowski et al., 2010; Moretti et al., 2011, Zeni et al., 2011). Desta forma, acredita-se que a via de sinalização L-arginina-NO-GMPc desempenha um importante papel na patofisiologia da depressão, como também no mecanismo de ação dos antidepressivos (Zomkowski et al., 2010).

Apesar do exato mecanismo de ação pelo qual substâncias que modulam o sistema glutamatérgico desencadeiam efeito antidepressivo não ter sido esclarecido, alguns autores sugerem que este efeito pode ser dependente da ativação de receptores AMPA (Autry et al., 2011; Li et al., 2010), ou ainda do aumento rápido de BDNF (Autry et al., 2011). Os níveis de plasmáticos de BDNF estão reduzidos em pacientes com depressão e são negativamente correlacionados com a severidade da doença (Lee et al., 2007), bem como o tratamento com antidepressivos clássicos acarreta em um aumento na expressão dessa neurotrofina (Martinowich et al., 2007). Ainda, animais *knockout* para produção de

BDNF apresentam comportamento tipo-depressivo, o que pode ainda induzir atrofia ou perda celular, assim como observado em pacientes com depressão (Gonul et al., 2005; Chan et al., 2006).

Além do exposto, alterações na regulação da neurotransmissão glutamatérgica têm sido implicadas na neuropatologia da depressão, uma vez que este sistema é funcionalmente interconectado com os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico (Paul et al., 1993). Assim, dados da literatura já demonstraram que a administração crônica (3 semanas) ou aguda de antidepressivos clássicos como a imipramina, reduzem de forma significativa as ondas de despolarização evocadas por glutamato em fatias de córtex pré-frontal (Michael-Titus et al., 2000). O tratamento com fluoxetina, desipramina ou reboxetina por um período de duas semanas também foi capaz de reduzir as ondas de despolarização evocadas por glutamato em sinaptossomas (Bonanno et al., 2005), mostrando a relação entre os sistemas glutamatérgico e monoaminérgico. A indução de proteínas de sinalização sináptica bem como o aumento do número e da função de sinapses no córtex pré-frontal de ratos desencadeado pelo uso de ketamina, também foi descrito e relacionado com a atividade antidepressiva desse antagonista do receptor NMDA (Li et al., 2010).

Apesar de consistentes evidências apontarem para o envolvimento do sistema glutamatérgico na patofisiologia da depressão, um pequeno progresso no desenvolvimento de medicamentos que atuem modulando este sistema foi realizado, o que pode ser atribuído aos efeitos colaterais decorrentes da sua utilização. Deste modo o entendimento de substâncias que atuem modulando este sistema apresentam-se como uma promessa substancial no tratamento de transtornos do humor.

1.3 ESTATINAS

As estatinas pertencem à classe de fármacos hipocolesterolemiantes mais prescrita em todo o mundo, inicialmente identificadas como metabólitos de fungos e conhecidas por afetar numerosos processos celulares via mecanismos que são dependentes ou independentes do colesterol (Pannu et al., 2007). A lovastatina foi a primeira estatina a ser aprovada para uso clínico em humanos, e desde então muitas estatinas naturais ou quimicamente modificadas tem sido comercializadas, de forma que esta é a classe de fármacos mais efetiva no tratamento dos altos níveis de colesterol (Liao e Laufs, 2005).

O passo limitante do processo de produção do colesterol é a conversão da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato pela enzima HMG-CoA redutase. O mecanismo de ação das estatinas é baseado na inibição competitiva reversível da enzima, o que acarreta em diminuição da síntese de colesterol pelos hepatócitos (Fig. 2) (Schachter, 2005). A redução da concentração intracelular do colesterol induz ao aumento da expressão de receptores para Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL), o que conseqüentemente contribui para a diminuição da concentração sanguínea de LDL (Hobbs et al., 1992) e aumento da concentração de Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) (Maron et al., 2000).

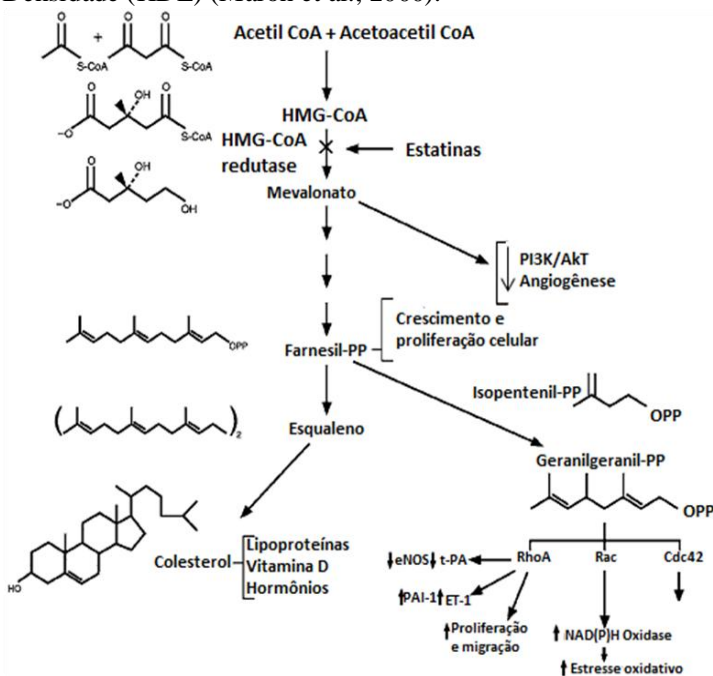


Figura 2. Via de biossíntese do colesterol. Diagrama da via de biossíntese do colesterol, mostrando os efeitos da inibição da HMG-CoA redutase por estatinas. A diminuição na isoprenilação de moléculas sinalizadoras como Ras, Rho e Rac, leva à modulação de várias vias de sinalização (Adaptado de Liao e Laufs, 2005).

Com relação à estrutura química as estatinas podem ser divididas em três partes: uma análogo do substrato da enzima alvo, HMG-CoA redutase; uma complexa estrutura de anel hidrofóbico ligado

covalentemente ao análogo do substrato e envolvido na ligação das estatinas com a enzima; e grupos laterais ao anel que definem a solubilidade e muito das propriedades farmacocinéticas do composto (Fig. 3) (Gaw e Packard, 2000). Os grupamentos hidrofóbicos volumosos das estatinas ocupam o sítio de ligação da HMG-CoA redutase, bloqueando assim a interação do substrato HMG. Existem sutis diferenças nos modos de interação entre os diferentes tipos de estatinas, sendo que os compostos sintéticos como a atorvastatina e a rosuvastatina possuem maior afinidade com HMG-CoA redutase (Istvan e Deisenhofer, 2001). As estatinas ligam-se a enzima marca-passo da via de síntese do colesterol de mamíferos em concentrações nanomolares, o que acarreta no deslocamento efetivo do substrato natural que se liga em concentrações milimolares (Moghadasian, 1999).

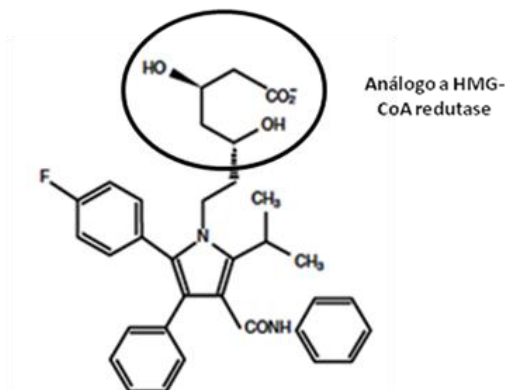


Figura 3. Estrutura química da atorvastatina, uma estatina sintética. A estrutura química das estatinas é formada por um análogo da HMG-CoA redutase; uma complexa estrutura de anel hidrofóbico e grupos laterais ao anel (Adaptado de Schachter, 2005).

As estatinas sintéticas de terceira geração como a atorvastatina são muito mais potentes do que os derivados da precursora mevastatina, apresentando-se como compostos ativos que compartilham propriedades físico-químicas com a pravastatina, porém apresentam maior lipofilicidade e tempo de meia-vida (McTaggart et al., 2001). Essas propriedades permitem a ligação de alta afinidade com a enzima HMG-CoA redutase e uma duração de efeito mais prolongada.

Por apresentarem diferente permeabilidade aos tecidos e metabolismo, as estatinas apresentam diferentes potências para inibir a

HMG-CoA redutase extra-hepática. Essas diferenças na permeabilidade aos tecidos estão correlacionadas à lipofilicidade da estrutura e associadas às diferenças observadas nos efeitos colaterais desencadeados pelo uso desse tipo de medicamento (Germershausen et al., 1989). Em contrapartida somente a lipofilicidade não prediz de forma exata a habilidade dessa classe de compostos em desencadear efeitos extra-hepáticos, ou efeitos “pleiotrópicos”, e outros fatores podem estar envolvidos. Acredita-se que esses efeitos “pleiotrópicos” ou independentes do colesterol são mediados pela inibição da síntese do mevalonato (Corsini et al., 1999).

A inibição de HMG-CoA redutase leva à inibição da síntese de um número importante de intermediários da via de biossíntese do colesterol como o farnesilpirofosfato (FPP) e o geranylgeranylpirofosfato (GGPF), o que pode por sua vez, induzir a mudanças pós-translacionais em uma série de proteínas citosólicas como as proteínas Rho e Ras da família de proteínas G de baixo peso molecular (Fig. 2) (Goldstein e Brown, 1990; Van Aelst e D’Souza-Schorey, 1997; Liao e Laufs, 2005). A isoprenilação de proteínas permite a ligação covalente, a localização subcelular e o tráfego intracelular de proteínas associadas a membrana. Os membros da família de GTPases, Ras e Rho são os principais substratos para modificação pós-translacional por prenilação (Van Aelst e D’Souza-Schorey, 1997; Hall, 1998). Ambas, Ras e Rho são pequenas proteínas ligantes de GTP que alternam entre ciclos de estado inativo (ligado a GDP) e estado ativo (ligado a GTP). As estatinas inibem a isoprenilação de proteínas Ras e Rho, levando ao acúmulo dessas proteínas inativas no citoplasma (Liao e Laufs, 2005).

Assim, as estatinas são capazes de desencadear efeitos benéficos independentes de sua capacidade em modificar a concentração de lipídios, e apesar das estatinas serem largamente utilizadas no tratamento das hipercolesterolemias (Stein, 2002), efeitos pleiotrópicos tem sido relatados, entre eles, efeitos antiinflamatórios (Yoshida et al., 2003), vasculares (Rader, 2003) e efeitos sobre doenças neurodegenerativas (Miida et al., 2007). Dados epidemiológicos sugerem que as estatinas podem ser uma estratégia protetora frente à doença de Alzheimer e outros tipos de demência (Vaughan et al., 2006; Shepardson et al., 2011; Sparks, 2011). Além disso, tem sido proposto que estatinas podem agir no tratamento da esclerose e da depressão (Liao e Laufs, 2005) e atuar diminuindo a ansiedade (Young-Xu et al., 2003), além de reduzir a incidência de isquemia através da regulação positiva da expressão e atividade de NOS endotelial (Kureishi et al. 2000).

Apesar de estatinas naturais ou sintéticas compartilharem o mesmo mecanismo de ação, existem diferenças quanto a atividade e farmacocinética desses fármacos. A atorvastatina é uma estatina sintética e lipossolúvel, que se liga extensivamente a proteínas plasmáticas e tem seletividade hepática quanto a inibição da HMG-CoA redutase. Em geral, os efeitos colaterais dessa estatina são bem tolerados (Schachter, 2004) e uma grande quantidade de dados clínicos tem demonstrado a segurança da utilização de altas doses de atorvastatina (Schwartz et al., 2001; Koren e Hunninghake, 2004), o que justifica a sua vasta utilização.

Efeitos pleiotrópicos da atorvastatina têm sido relatados na literatura, em especial seus efeitos em nível de SNC. Em cultura de neurônios corticais, o pré-tratamento com atorvastatina foi capaz de prevenir a morte celular induzida pela toxicidade glutamatérgica (Bösel et al., 2005). Além disso, o tratamento de camundongos com atorvastatina (10mg/kg, por via oral (p.o.), uma vez/dia, 7 dias consecutivos), após a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo $A\beta_{1-40}$ foi neuroprotetor, diminuindo a resposta inflamatória, o estresse oxidativo e aumentando a expressão de transportadores de glutamato (Piermartiri et al., 2010). O tratamento com atorvastatina por uma semana aumenta a sobrevida neuronal e a sinaptogênese em hipocampo após lesão por trauma encefálico (Lu et al., 2004). Ainda, a atorvastatina foi capaz de prevenir convulsões e morte celular induzida pelo ácido quinolínico, um agonista dos receptores NMDA (Piermartiri et al., 2009).

Apesar de dados da literatura demonstrarem diversos efeitos pleiotrópicos da atorvastatina, e autores sugerirem uma relação entre o uso de estatinas e o bem estar psicológico, nenhum estudo que avalie o efeito tipo-antidepressivo da administração de atorvastatina e a relação com os efeitos neuroprotetores da mesma foi até então relatado, o que justifica a execução deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo avaliar a associação entre o efeito neuroprotetor e antidepressivo da atorvastatina e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessa atividade. Além disso, serão avaliadas as vias de sinalização envolvidas, e a possível alteração nos níveis de proteínas relacionadas à sobrevivência celular e à transmissão glutamatérgica.

2.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito tipo-antidepressivo da administração p.o. de atorvastatina a camundongos submetidos ao TNF e ao TSC;
- ✓ Determinar o envolvimento do sistema glutamatérgico (NMDA - via L-arginina-NO-GCs-GMPc) no possível efeito tipo-antidepressivo decorrente da administração de atorvastatina a camundongos;
- ✓ Avaliar o efeito neuroprotetor da atorvastatina contra a toxicidade glutamatérgica *in vitro*;
- ✓ Avaliar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no efeito neuroprotetor decorrente da administração de atorvastatina a camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Camundongos albinos Swiss machos (30-40g) foram mantidos em temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ em um ciclo de 12 horas claro (a partir das 7 horas) e 12 horas escuro, em caixas plásticas (15 animais por caixa) com água e ração disponíveis. A utilização de animais foi aprovada pelo CEUA/UFSC sob número de protocolo PP559 e todos os experimentos foram projetados de maneira que os animais tivessem o mínimo de sofrimento possível.

3.2 ADMINISTRAÇÃO P.O. DE ATORVASTATINA

Foram utilizados dois protocolos diferenciados de tratamento, sendo um tratamento agudo e um tratamento repetido (sub-crônico): I) Tratamento agudo: Os animais receberam uma única administração de atorvastatina (Lipitor Atorvastatin calcium, Pfizer) (0,01; 0,1; 1; 10 ou 30mg/kg, p.o.) e após um período de 60 minutos os animais foram submetidos a avaliação comportamental ou bioquímica; II) Tratamento sub-crônico: Os animais foram tratados com diferentes concentrações (0,1; 1; 10mg/kg, p.o.) de atorvastatina (Lipitor Atorvastatin calcium, Pfizer) uma vez ao dia durante 7 dias consecutivos, sendo que no oitavo dia os animais foram submetidos a avaliação comportamental ou bioquímica. Animais controles foram tratados com salina (NaCl 0,9%) por via oral durante o mesmo período. Animais tratados com Fluoxetina (10mg/kg, p.o.) foram utilizados como controle positivo. O tratamento foi realizado pela administração de 10 μL /g de peso do animal, tanto para as soluções de atorvastatina como para a solução de salina.

3.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

3.3.1 Teste de Suspensão pela Cauda (TSC)

O tempo total de duração da imobilidade foi medida de acordo com o método determinado por Steru e colaboradores (1985). Os camundongos, acústica e visualmente isolados foram suspensos 50 cm acima do chão por fita adesiva e a imobilidade foi registrada durante 6 minutos, conforme descrito anteriormente (Mantovani et al., 2003). Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (Steru et al., 1985).

3.3.2 Teste do Nado Forçado (TNF)

O teste foi realizado durante um período de 6 minutos em um cilindro plástico (altura 24 cm, diâmetro 10 cm) contendo 19 cm de água a 25°C. O tempo de imobilidade foi cronometrado, conforme descrito anteriormente (Mantovani et al., 2003; Zomkowski et al., 2005). Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (Porsolt et al., 1977).

3.3.3 Avaliação da atividade locomotora pelo Teste do Campo Aberto (TCA)

A fim de excluir a possibilidade de que um eventual efeito semelhante a antidepressivo, ou seja, uma redução da imobilidade nos TNF e TSC seja devida a um aumento na atividade locomotora causada pela administração p.o. de atorvastatina, os camundongos foram submetidos a uma sessão no TCA, 60 minutos após a administração da atorvastatina, como descrito por Rodrigues et al. (1996). O teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm altura, com o chão dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com as quatro patas (cruzamentos) foi registrado em uma sessão de 6 minutos.

3.4 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS NEUROTRANSMISORES NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ATORVASTATINA *IN VIVO*

Para avaliar o envolvimento de neurotransmissores na possível atividade tipo antidepressiva da atorvastatina, agonistas, antagonistas e inibidores foram administrados aos animais por via intraperitoneal (i.p.), p.o. ou via intracerebroventricular (i.c.v.), antes ou após o tratamento com atorvastatina.

3.4.1 Avaliação da participação do receptor NMDA e da via L-arginina-NO no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina

Para avaliar a participação do receptor NMDA no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina em camundongos, os animais foram pré-tratados com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v.) (Zeni et al., 2011) e 15 minutos após receberam atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o.) ou salina. Após

um período de 60 minutos os animais foram submetidos ao TST e ao TCA. Em outra série de experimentos avaliou-se o efeito da combinação de doses sub efetiva de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o) com uma dose sub efetiva de MK-801 (0,001 mg/kg, i.p, um antagonista NMDA) (Zomkowski et al., 2010; Zeni et al., 2011). Atorvastatina ou salina foram administradas 30 minutos antes do MK-801. Após um período de 30 minutos pós-administração do MK-801 os animais foram submetidos ao TSC.

Para avaliar o envolvimento da via L-arginina-NO os animais foram pré-tratados com L-arginina, um precursor do NO (750 mg/kg, intra-peritoneal (i.p), dose que não produz efeito no TSC) (Kaster et al., 2005; Zomkowski et al., 2010; Zeni et al., 2011) ou salina e após 30 minutos receberam atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o) ou salina e ao final de 60 minutos foram submetidos ao TSC. Avaliou-se também o efeito da administração combinada de doses subativas de 7-nitroindazol (50 mg/kg, i.p., inibidor da NOS), 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ) (30 pmol/sítio i.c.v., um inibidor da GCs) ou azul de metileno (20 mg/kg, i.p., um inibidor da NOS e da GCs) (Zomkowski et al., 2010; Zeni et al., 2011). Atorvastatina ou salina foram administradas 30 minutos antes do 7-nitroindazol e do azul de metileno, ou 40 minutos antes do ODQ. Após 30 minutos da administração de 7- nitroindazol ou azul de metileno e 20 minutos após administração de ODQ os animais foram submetidos ao TSC.

A fim de investigar o papel da GMPc no efeito antidepressivo da atorvastatina, os animais receberam sildenafil (5mg/kg, i.p., um inibidor da PDE-5) (Zomkowski et al., 2010; Zeni et al., 2011) ou salina, 30 minutos antes da administração de atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o.) e após 60 minutos os animais foram submetidos ao TSC.

3.5 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA DA ATORVASTATINA CONTRA A TOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

Para as análises bioquímicas, grupos independentes de animais foram utilizados, de modo que os animais empregados nestas análises não passaram por avaliação comportamental.

3.5.1 Preparação de fatias hipocampais e corticais

Após o tratamento com atorvastatina os animais foram mortos por decapitação (60 minutos após a administração ou no oitavo dia após o

início do tratamento) e os hipocampus e os córtices cerebrais frontais foram rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain e foram pré-incubadas em tampão KRB por 30 min a 37 °C, sendo gaseificadas com carbogênio (Molz et al., 2005).

3.5.2 Indução da toxicidade glutamatérgica em fatias hipocampais e corticais

O dano celular excitotóxico foi induzido através da incubação das fatias de hipocampo e córtex cerebral por 1 hora com glutamato (10mM) (Molz et al., 2008) em tampão KRB. Após este período, o meio foi retirado e substituído por meio de cultura composto por 50% de Krebs-Ringer, 50% de meio de cultura (Dubelco's-MEM), 20 mM de HEPES (pH 7,4) e 100 µg/ml de gentamicina e as fatias incubadas por mais 3, 4 ou 6 horas. Após esse período, a viabilidade celular das fatias foi avaliada pelo método de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio = Thiazolyl blue).

3.5.3 Ensaio da viabilidade celular

Ao final do experimento de indução da toxicidade glutamatérgica, a viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Jacobsson e Fowler, 1999). Após o período de exposição ao glutamato, o meio foi substituído por uma solução de 0,5 mg/ml de MTT (em 200 µL) e as fatias hipocampais e corticais foram incubadas à 37 °C por 30 minutos. Esta solução foi descartada e o sal de formazam reduzido nas fatias cerebrais foi solubilizado pela adição do mesmo volume de dimetil-sulfóxido (DMSO). A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (550 nm).

3.5.4 Liberação de glutamato

A liberação de glutamato foi realizada segundo descrito por Molz et al. (2008). Após a incubação, o meio contendo tampão KRB ou

glutamato (10 mM, 15 minutos) foi retirado e as fatias de hipocampo incubadas com Solução tampão de Hank (HBSS) por 15 min. Em seguida adicionou-se 0,33 $\mu\text{Ci/ml}$ de D-[^3H]Aspartato - um análogo do glutamato que não é metabolizado pelas células (concentração final 100 μM) por 7 min iniciando a captação. Após esse período as fatias foram lavadas 3 vezes com HBSS gelado para a retirada do excesso de D-[^3H]Aspartato livre. As fatias foram novamente incubadas por 15 minutos em 300 μl de HBSS, o sobrenadante coletado foi utilizado para medir a quantidade de D-[^3H]Aspartato liberado. As fatias foram solubilizadas em uma solução de 0,1 N NaOH/ 0,01% SDS. A determinação do conteúdo intracelular e extracelular de D-[^3H]Aspartato foi avaliada em um contador de cintilação líquida e a porcentagem de aspartato liberado foi expresso em relação a quantidade total de D-[^3H]Aspartato.

3.6 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS

3.6.1.Preparação da amostras

Após o tratamento, os hipocampus foram solubilizados em tampão de extração de proteínas contendo 4 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), 2 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 8% β -mercaptoethanol, e 50 mM Tris (pH 6.8) (Molz et al., 2008).

3.6.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada por método de Peterson (1977). Albumina Bovina Sérica (Sigma) foi utilizada como padrão.

3.6.3 Separação de proteínas

As proteínas (60 $\mu\text{g/poço}$) foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS), utilizando gel de separação de poliacrilamida com concentração de 12%, e gel de entrada 4% (Bunn et al., 1995). A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 140 mV (para 2 géis) durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos a eletrotransferência.

3.6.4 Eletrotransferência e imunodeteção

As proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45 μm) (1,5 horas a 4°C, 350 mA). Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 1 h com albumina 2% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) e a seguir lavadas com TBS-T (Tween-20 0,05 %, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Finalmente as membranas foram incubadas com os anticorpos específicos anti-BDNF (Milipore, diluição 1:1000) e anti-actina (*Cell Signalling*, diluição 1:1000). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário ligado à peroxidase (diluição 1:5000) e após lavagens, foram reveladas em filme autoradiográfico após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose (Kit ECL), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através da análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguida do teste de Tukey ou do teste de Duncan. Os dados foram expressos como a média e desvio padrão. Para os experimentos comportamentais utilizou-se um número de 6 a 10 animais por grupo. Já as análises bioquímicas foram realizadas em triplicatas com número mínimo de 5 experimentos. Foram considerados significativos valores com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação de Mestrado foram divididos em duas partes. A parte I apresenta os resultados do efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina e o envolvimento da via da L-arginina-NO-GMPc e BDNF neste efeito. A parte II apresenta os resultados relacionados à atividade neuroprotetora da atorvastatina contra a toxicidade glutamatérgica.

PARTE I - Tratamento agudo com atorvastatina desencadeia efeito tipo-antidepressivo em camundongos através da modulação da via L-arginina-NO-GMPc e aumenta a expressão de BDNF

4.1 EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ATORVASTATINA EM CAMUNDONGOS

O efeito do tratamento agudo da atorvastatina (p.o.) no tempo de imobilidade no TNF e no TSC é mostrado na Fig. 1A e 1B respectivamente. A atorvastatina (0,1 – 30 mg/kg) diminuiu o tempo de imobilidade no TNF ($F(5,41) = 14.90$, $p < 0,01$) e também no TSC (0,1 – 30 mg/kg) ($F(5,39) = 20.68$, $p < 0,01$). Em contrapartida a atorvastatina não produziu nenhuma alteração na atividade locomotora dos animais, avaliada no campo aberto, quando comparados com o grupo controle ($F(5,41) = 0.87$, $p = 0,51$) (1C). A administração de atorvastatina na dose de 0,01 mg/kg (p.o.) foi inefetiva na redução do tempo de imobilidade tanto no TNF como no TSC, sendo considerada a dose subativa para os experimentos subsequentes.

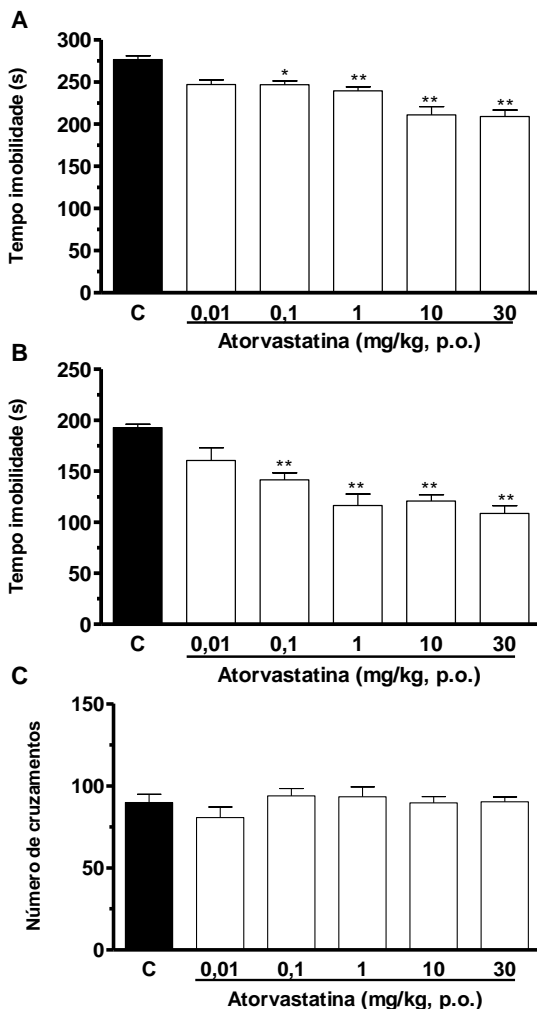


Figura 1. Efeito tipo antidepressivo da administração aguda de atorvastatina a camundongos. Efeito da administração oral de atorvastatina (0,01–30 mg/kg) no tempo de imobilidade no TNF (A), TSC (B) e no número de cruzamentos no TCA (C). Atorvastatina (p.o.) foi administrada 1 hora antes dos testes. Valores foram expressos como média + erro padrão ($n=6-10$). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle tratado com salina (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

A duração do efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina no tempo de imobilidade no TSC está apresentada na Fig. 2A. O tratamento com atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o.) produziu um efeito significativo no TSC 1 hora após a administração, e este efeito permaneceu estatisticamente significativo por um período de 4 horas após a administração. A análise estatística (ANOVA de duas vias, seguida do teste de Tukey) mostrou um efeito significativo do tratamento com atorvastatina ($F_{1,41} = 51,99$, $p < 0,01$) e tratamento com atorvastatina X interação com o período de tempo ($F_{(3,41)} = 4,50$, $p < 0,01$) mas não no período de tempo ($F_{(3,41)} = 1,52$, $p = 0,22$) no TSC. Nenhuma alteração foi observada na atividade locomotora dos animais tratados com atorvastatina quando comparados ao grupo controle como mostra a Fig. 2B (Tratamento: $F_{(1,40)} = 1,11$, $p = 0,30$; tempo: $F_{(3,40)} = 0,66$, $p = 0,58$; tratamento×tempo (interação): $F_{(3,40)} = 0,62$, $p = 0,61$). Ainda, a análise *post hoc* mostrou que a atorvastatina exibe efeitos similares em 1 e 2 horas, apesar de que o efeito tipo-antidepressivo é diminuído com 4 horas e não mais observado nas 12 horas.

Considerando que a dose de atorvastatina 0,1 mg/kg (p.o.) foi a mais baixa dose efetiva (1 hora antes das análises comportamentais), todos os experimentos para avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo desse fármaco foram realizados utilizando esta dose ativa. Uma vez que o TSC apresentou-se mais sensível que o TNF ao efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina, este foi o teste escolhido para a realização dos experimentos subseqüentes.

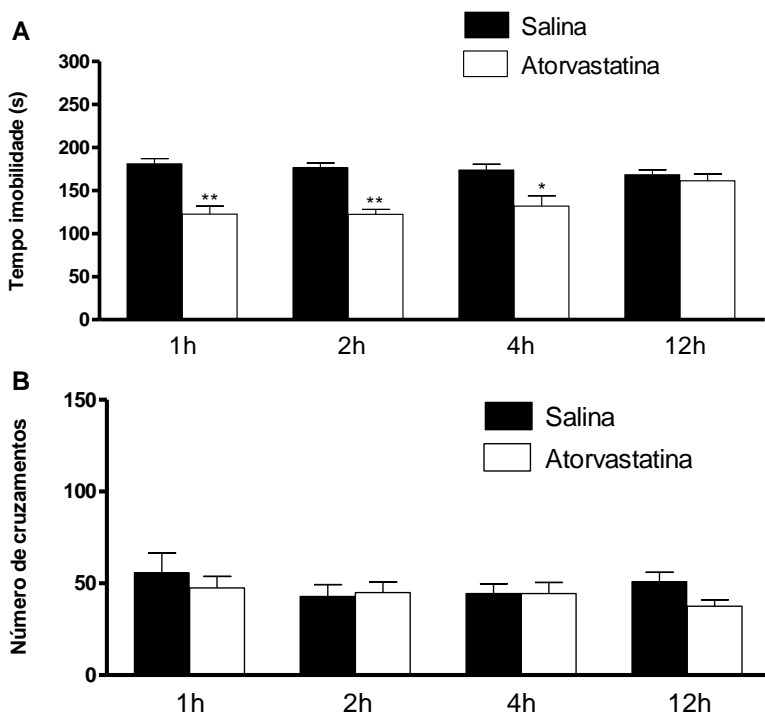


Figura 2. Tempo de duração do efeito da administração aguda de atorvastatina a camundongos no TSC. Tempo de duração do efeito da administração oral da atorvastatina (0,1 mg/kg) no tempo de imobilidade no TSC (A) e no número de cruzamentos no TCA (B) em camundongos. Atorvastatina foi administrada 1, 2, 4 ou 12h antes do teste. Valores são expressos como média + erro padrão ($n=6-7$). ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ comparados com os animais do grupo controle tratados com salina (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

4.2 ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NMDA NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ATORVASTATINA NO TSC

O pré-tratamento dos animais com NMDA (0,1 pmol/sítio) foi capaz de reverter o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC (Pré-tratamento: $F(1,22) = 12,88$, $p < 0,01$;

tratamento: $F(1,22) = 4,56$, $p < 0,01$; pré-tratamento×tratamento (interação): $F(1,22) = 7,11$, $p < 0,01$ como mostra a Fig. 3A. A administração de NMDA sozinho ou em combinação com atorvastatina não afetou a atividade locomotora no TCA (Fig. 3B) (Pré-tratamento: $F(1,24) = 1,58$, $p = 0,22$; tratamento: $F(1,24) = 0,13$, $p = 0,72$; pré-tratamento×tratamento (interação): $F(1,24) = 0,66$, $p = 0,43$).

A Fig. 3C mostra que o MK-801 (0,001 mg/kg, i.p.) em combinação com uma dose subativa de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) produziu um efeito tipo-antidepressivo no TSC (Pré-tratamento: $F(1,20) = 52,49$, $p < 0,01$; tratamento: $F(1,20) = 43,91$, $p < 0,01$; pré-tratamento×tratamento (interação): $F(1,20) = 21,93$, $p < 0,01$). A administração de MK-801 sozinho ou em combinação com atorvastatina não afetou a atividade locomotora no TCA (Fig. 3D) (Pré-tratamento: $F(1,20) = 0,02$, $p = 0,89$; tratamento: $F(1,20) = 0,52$, $p = 0,48$; pré-tratamento×tratamento (interação): $F(1,20) = 0,36$, $p = 0,56$).

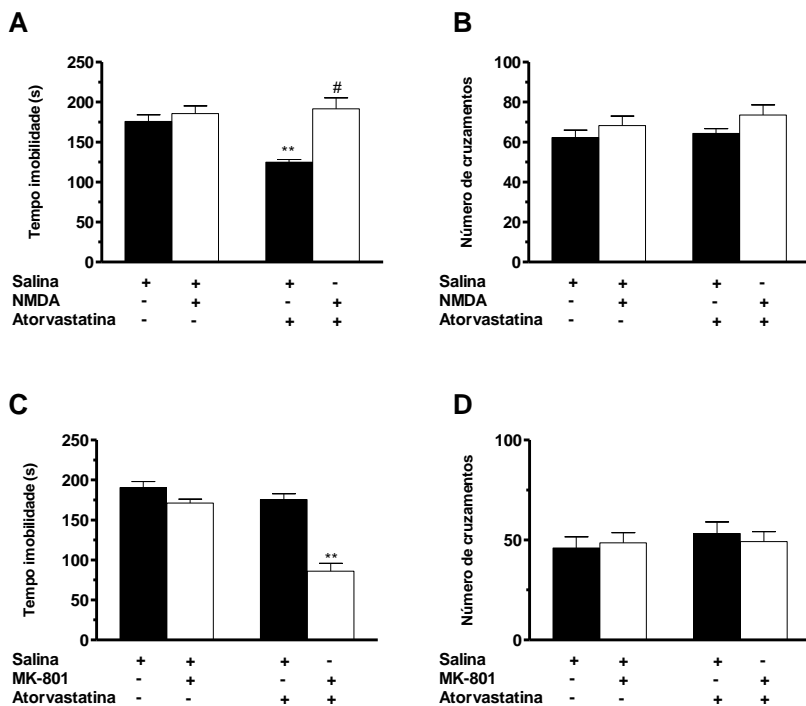


Figura 3. Envolvimento do receptor NMDA no efeito tipo-antidepressivo da administração aguda de atorvastatina a camundongos. Efeito do pré-tratamento dos camundongos com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v.) no efeito de anti-imobilidade da atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). O efeito do pré-tratamento dos animais usando a dose subativa da atorvastatina (0,01mg/Kg, p.o.) combinada com MK-801 (0.001 mg/Kg, i.p.) no tempo de imobilidade no TSC (painel C) e no número de cruzamentos no TCA (painel D) (Valores foram expressos como média + erro padrão ($n=6-8$)). ** $p<0,01$ quando comparados como o grupo controle tratado com salina; # $p<0,01$ comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey).

4.3 ENVOLVIMENTO DA VIA L-ARGININA-NO-GMPc NO EFEITO TIPO-ANTIDERESSIVO DA ATORVASTATINA NO TSC

A Fig. 4A mostra que o pré-tratamento com L-arginina (750 mg/kg i.p., um precursor do NO) preveniu o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina (0,1 mg/kg) no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas entre o pré-tratamento com L-arginina ($F(1,21) = 12,28$, $p < 0,01$), tratamento com atorvastatina ($F(1,21) = 18,58$, $p < 0,01$), interação L-arginina \times atorvastatina ($F(1,21) = 10,45$, $p < 0,01$). A administração da atorvastatina sozinha ou em combinação com L-arginina não afetaram a atividade locomotora no TCA (Fig. 4B) (Pré-tratamento: $F(1,24) = 0,56$, $p = 0,46$; tratamento: $F(1,24) = 0,08$, $p = 0,78$; pré-tratamento \times tratamento (interação): $F(1,24) = 0,01$, $p = 0,93$).

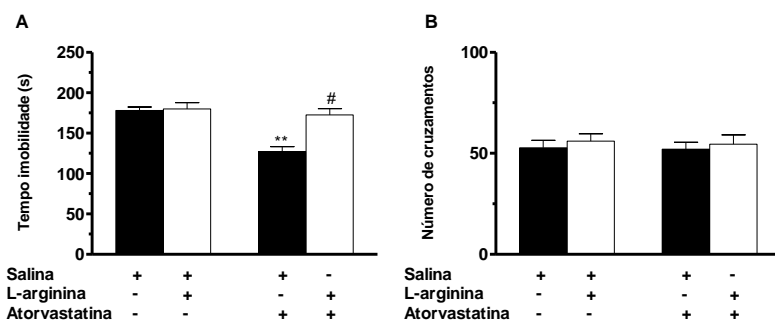


Figura 4. Participação da L-arginina no efeito da administração aguda de atorvastatina a camundongos no TSC. Efeito do pré-tratamento dos camundongos com L-arginina (750mg/kg, i.p.) no efeito de anti-imobilidade da atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). Valores foram expressos como média + erro padrão ($n=6-7$). ** $p < 0,01$ quando comparados como o grupo controle tratado com salina; # $p < 0,01$ comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey).

A administração de uma dose sub efetiva de 7-nitroindazol (50 mg/kg i.p., um inibidor seletivo da NOSn) em combinação com uma dose sub efetiva de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) produziu um efeito tipo-antidepressivo quando comparado com a administração de qualquer uma das drogas sozinhas, como mostra a Fig.5A. ANOVA de duas vias

revelou diferenças significativas para o pré-tratamento com atorvastatina ($F(1,20) = 11,83, p < 0,01$), tratamento com 7-nitroindazol ($F(1,20) = 24,26, p < 0,01$) e interação atorvastatina \times 7-nitroindazol ($F(1,20) = 6,00, p < 0,05$). A Fig. 5B mostra que a administração de 7-nitroindazol sozinho ou em combinação com atorvastatina não afetou a atividade locomotora no TCA (Pré-tratamento: $F(1,20) = 0,59, p = 0,45$; tratamento: $F(1,20) = 0,67, p = 0,42$; pré-tratamento \times tratamento (interação): $F(1,20) = 0,01, p = 0,93$).

A Fig. 5C mostra que a combinação de doses sub efetivas de azul de metileno (20 mg/kg i.p., inibidor da NOS e da GCs) e atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) também produziu um efeito tipo-antidepressivo no TSC quando comparado com a administração das drogas isoladamente. Diferença estatística foi observada entre o pré-tratamento com atorvastatina ($F(1,20) = 13,28, p < 0,01$), o tratamento com azul de metileno ($F(1,20) = 22,03, p < 0,01$) e a interação atorvastatina \times azul de metileno ($F(1,20) = 5,7, p < 0,05$). A administração do azul de metileno sozinho ou em combinação com a atorvastatina não alterou a atividade locomotora dos animais no TCA (fig.5D) (Pré-tratamento: $F(1,20) = 0,19, p = 0,67$; tratamento: $F(1,20) = 0,03, p = 0,87$; pré-tratamento \times tratamento (interação): $F(1,20) = 0,21, p = 0,65$).

Para observar o envolvimento da GCs no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina, ODQ (30 pmol/sítio i.c.v., um inibidor específico da GCs) foi utilizada em combinação com atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.). Como mostra a Fig. 5E, ODQ (dose subativa) em combinação com uma dose sub-efetiva de atorvastatina foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade nos animais submetidos ao TSC quando comparados com os animais que receberam as drogas isoladamente. A análise estatística revelou diferenças significativas entre o tratamento com ODQ ($F(1,22) = 24,19, p < 0,01$) e a interação atorvastatina \times ODQ ($F(1,22) = 10,42, p < 0,01$), mas não com o pré-tratamento com atorvastatina ($F(1,22) = 0,01, p = 0,92$). A administração de ODQ sozinho ou combinado com atorvastatina não afetou a atividade locomotora dos animais no TCA (Fig. 5F) (Pré-tratamento: $F(1,20) = 0,77, p = 0,39$; tratamento: $F(1,20) = 0,24, p = 0,63$; interação: $F(1,20) = 1,60, p = 0,22$).

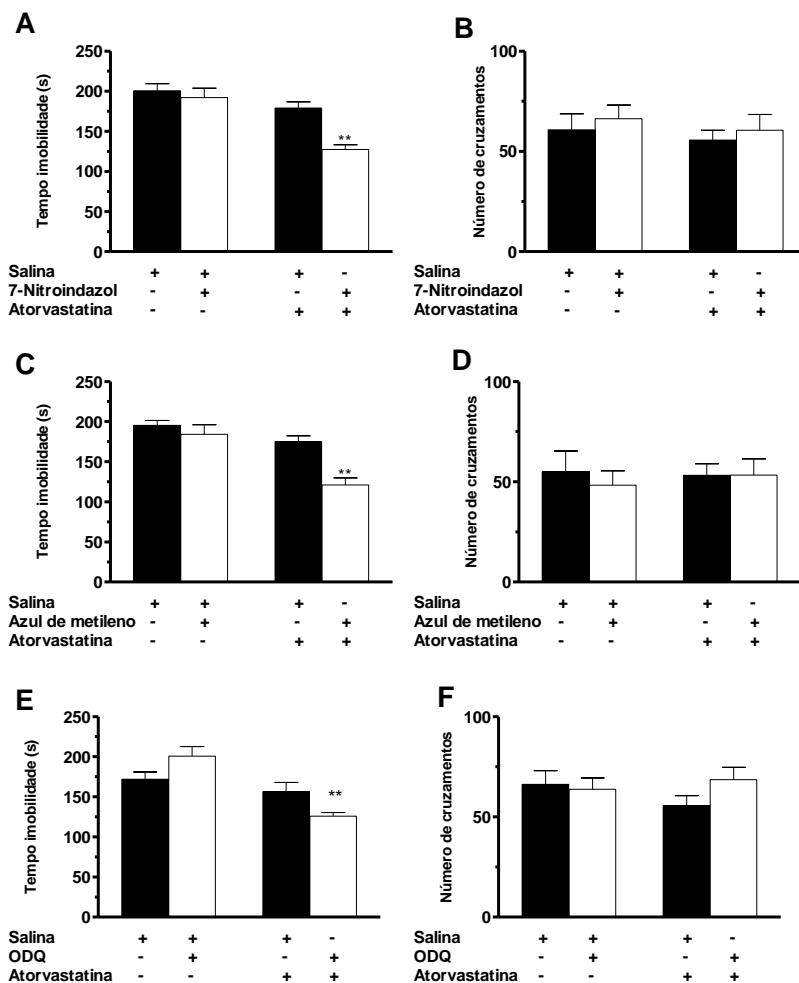


Figura 5. Envolvimento da NOSn e da GCs no efeito tipo antidepressivo decorrente da administração aguda de atorvastatina a camundongos. Efeito de doses subativas do 7-nitroindazol (50 mg/kg, i.p.), azul de metileno (20 mg/kg, i.p.) ou ODQ (30 pmol/sítio, i.c.v.) em combinação com uma dose sub-efetiva de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) no TSC em camundongos (painéis A, C e E, respectivamente) e no TCA (painéis B, D e F, respectivamente). Valores foram expressos como média + erro padrão ($n=6-8$). ** $p<0,01$ quando comparados como

o grupo controle tratado com salina ou com atorvastatina; # $p<0,01$ comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey).

De maneira complementar, o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o.) foi completamente prevenido pelo pré-tratamento dos animais com sildenafil (5 mg/kg, i.p., inibidor da PDE-5) como mostra a Fig. 6A. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas entre o pré-tratamento com sildenafil ($F(1,20) = 5,41$, $p<0,05$), o tratamento com atorvastatina ($F(1,20) = 11,32$, $p<0,01$) e a interação sildenafil \times atorvastatina ($F(1,20) = 12,41$, $p<0,01$). A administração de sildenafil sozinho ou em combinação com atorvastatina não afetou a atividade locomotora dos animais no TCA (Fig. 6B) (Pré-tratamento: $F(1,24) = 1,59$, $p=0,22$; tratamento: $F(1,24) = 0,37$, $p=0,55$; pré-tratamento \times interação: $F(1,24) = 0,18$, $p=0,68$).

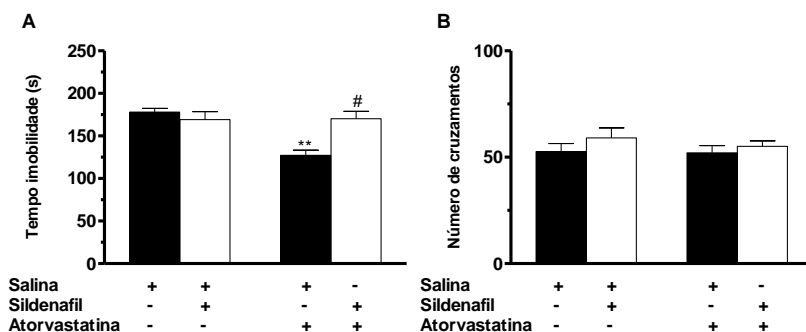


Figura 6. Participação da PDE-5 no efeito tipo-antidepressivo da administração aguda de atorvastatina a camundongos. Efeito do pré-tratamento dos camundongos com sildenafil (5 mg/kg, i.p.) no efeito tipo antidepressivo da atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC (A) e no número de cruzamentos no TCA (B). Valores foram expressos como média + erro padrão ($n=6-7$). ** $p<0,01$ quando comparados como o grupo controle tratado com salina; # $p<0,01$ comparado com o mesmo grupo pré tratado com salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey).

4.4 TRATAMENTO AGUDO COM ATORVASTATINA AUMENTA OS NÍVEIS HIPOCAMPAIS DE BDNF EM CAMUNDONGOS

Os camundongos receberam atorvastatina (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/kg, p.o.) 1 h antes de serem mortos. Os hipocampus foram retirados e amostras para *western blotting* foram preparadas. O tratamento agudo com atorvastatina, nas mesmas doses capazes de promover um efeito tipo-antidepressivo, aumentaram de maneira significativa os níveis hipocampais de BDNF (*ex vivo*) (Fig.7). Esses resultados sugerem uma possível relação entre o aumento dos níveis hipocampais de BDNF e o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina. Nenhuma alteração significativa foi observada para β -actina (proteína utilizada como controle de carregamento de proteínas na eletroforese).

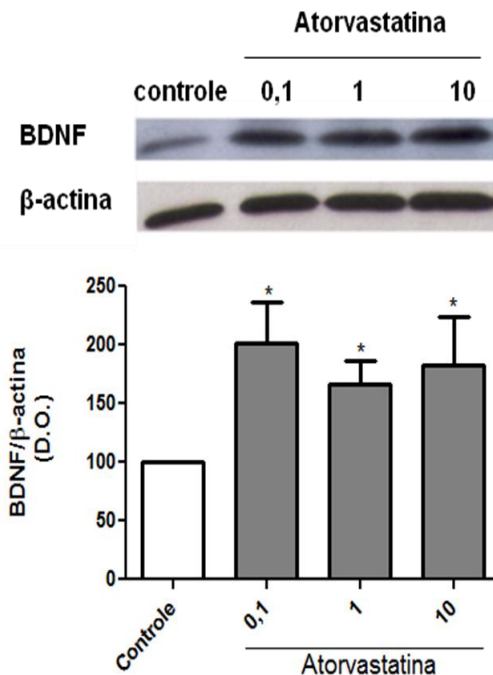


Figura 7. Efeito da administração aguda de atorvastatina a camundongos nos níveis hipocampais de BDNF. Tratamento oral com atorvastatina aumenta os níveis hipocampais de BDNF. Camundongos foram agudamente tratados com atorvastatina (0,1, 1 ou 10 mg/kg, p.o.) 1 h antes da dissecação hipocampal e preparação das amostras para eletroforese e imunodeteção dos níveis de BDNF (avaliação *ex vivo*).

(A) Western blotting representativo da expressão de BDNF (14 kDaltons) e β -actina; (B) Quantificação da razão entre BDNF/ β -actina. A densidade óptica das bandas foi mensurada pelo software Scion Image. Os dados estão representados como média + desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicata. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do Teste de Duncan).

PARTE II – Tratamento subcrônico com atorvastatina previne da excitotoxicidade glutamatérgica via diminuição da liberação de glutamato e desencadeia efeito tipo-antidepressivo

4.5 EFEITO NEUROPROTETOR DA ATORVASTATINA FRENTE A TOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA EM FATIAS HIPOCAMPAIS E CORTICAIS

Considerando que o tratamento agudo com atorvastatina (0,1 – 30 mg/kg, p.o.) foi capaz de desencadear um efeito tipo antidepressivo bastante expressivo no TSC, e que este efeito é pelo menos em parte dependente da ativação da via NMDA-L-arginina-NO (como descrito na parte I dos resultados), avaliou-se o possível efeito neuroprotetor do tratamento com atorvastatina frente a excitotoxicidade glutamatérgica (*ex vivo*). Utilizamos o protocolo experimental descrito por Molz e colaboradores (2008) e o adaptamos realizando uma curva de tempo de incubação, após o desafio com glutamato, conforme demonstrado na figura 1. Fatias hipocampais e corticais foram submetidas ao insulto com glutamato (10 mM em KRB) por 1 hora. Após este período, as fatias permanecerem em meio de cultura por 3, 4 ou 6 horas, e a influência do tempo de incubação na viabilidade celular das fatias foi avaliado pelo método de redução do MTT. Todos os tempos de incubação avaliados foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular (Fig.1). O protocolo de 1 hora de incubação com glutamato seguido de 4 horas em meio de cultura foi o escolhido para a realização dos experimentos subseqüentes.

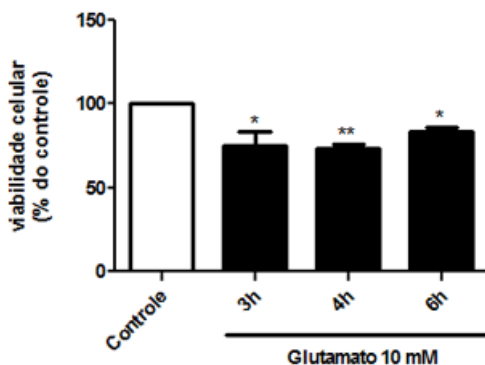


Figura 1. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas a um modelo *in vitro* de toxicidade glutamatérgica. As fatias foram mantidas em KRB (controle) ou glutamato 10mM em KRB por 1 hora. Após esse período o meio foi trocado por meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 3, 4 ou 6 horas. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) que foi incubado por 20 minutos a 37° C, e a viabilidade celular foi avaliada a 550 nm. O grupo controle foi considerado como tendo 100% de viabilidade celular. Os valores apresentam a média + desvio padrão de 6 experimentos em triplicata (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan). * indica grupos significativamente diferentes do grupo controle (100%) $p < 0,05$; **indica grupos significativamente diferentes do controle (100%) $p < 0,01$.

Animais foram tratados com atorvastatina nas mesmas doses que apresentaram efeito tipo-antidepressivo nos testes comportamentais realizados previamente (0,1; 1,0; 10mg/kg p.o.). Os animais controles foram tratados com salina, e fluoxetina (10 mg/kg, p.o., dose ativa, no TSC) foi utilizada como controle positivo. Decorridos 60 minutos do tratamento, os animais foram mortos por decapitação. Os hipocampus e o córtex frontal foram dissecados, as fatias (400 μ m) foram obtidas e submetidas ao protocolo de toxicidade glutamatérgica (Fig. 1, parte II). A viabilidade das fatias foi avaliada por redução do MTT.

A Fig. 2 mostra que em nenhuma das doses testadas a atorvastatina foi capaz de prevenir a perda de viabilidade celular desencadeada pela adição de glutamato 10 mM, nem no hipocampo (A)

e nem no córtex pré-frontal (B). A fluoxetina também foi ineficaz em prevenir a perda de viabilidade celular desencadeada pela incubação das fatias com glutamato (10mM), nas duas estruturas avaliadas.

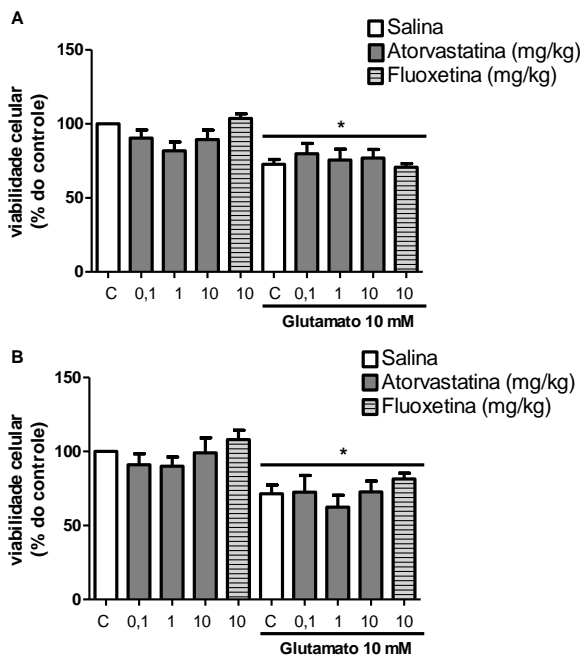


Figura 2. Avaliação do efeito neuroprotetor da administração aguda de atorvastatina a camundongos. Análise *ex vivo* da viabilidade celular em fatias de hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) incubados com glutamato 10 mM por 1 hora. Salina ou Atorvastatina (0,1, 1,0 ou 10 mg/kg, p.o.) foram administradas aos camundongos por gavagem (1h antes do preparo das fatias). Fluoxetina (10 mg/kg, p.o) foi utilizada como controle positivo. As fatias foram submetidas a 1h com glutamato 10mM. Após esse período o meio foi substituído por meio de cultura sem glutamato e mantido por 4 horas adicionais. O grupo controle (primeira barra branca) foi considerado como 100%. Os valores apresentam a média + desvio padrão de no mínimo 6 experimentos em triplicata (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan). * indica grupos significativamente diferentes do grupo controle (100%), enquanto e iguais ao grupo glutamato, $p < 0,05$.

Uma vez que o efeito neuroprotetor da atorvastatina frente a toxicidade glutamatérgica foi previamente demonstrada em cultura de

células corticais (Bosel et al., 2005) e que dados prévios do nosso grupo demonstraram que o tratamento subcrônico com atorvastatina (10 mg/kg p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos) foi capaz de prevenir a toxicidade induzida por ácido quinolínico (Piermartiri et al., 2009) e pelo peptídeo beta-amilóide (Piermartiri et al., 2010), avaliou-se o efeito neuroprotetor do tratamento subcrônico da atorvastatina frente ao protocolo de toxicidade induzida por glutamato em fatias hipocampus e corticais. O efeito de um antidepressivo clássico (fluoxetina 10 mg/Kg p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos) frente ao protocolo de toxicidade glutamatérgica também foi avaliado.

Corroborando com os dados prévios do nosso grupo a Atorvastatina (10 mg/kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos), foi capaz de prevenir a perda de viabilidade celular induzida por glutamato nas fatias hipocampus (Fig. 3A), porém não nas fatias corticais (Fig. 3B). De maneira semelhante a fluoxetina também foi capaz de prevenir a perda de viabilidade celular desencadeada pelo glutamato nas fatias hipocampus (Fig. 3A), porém não nas fatias corticais (Fig. 3B).

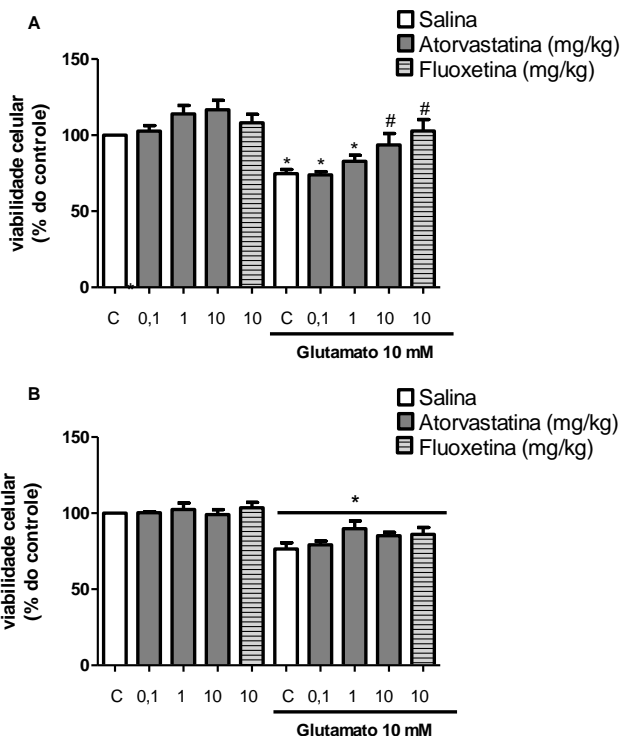


Figura 3. Avaliação do efeito neuroprotetor da administração repetida de atorvastatina a camundongos. Análise *ex vivo* da viabilidade celular em fatias de hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) incubadas com glutamato 10 mM por 1 hora. Salina ou atorvastatina (0,1, 1,0 ou 10 mg/kg, p.o.) foram administradas aos camundongos por gavagem (1 vez/dia, 7 dias consecutivos). Fluoxetina (10mg/Kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos) foi usada como controle positivo. No oitavo dia os animais foram mortos por decapitação, as fatias foram obtidas e submetidas ao protocolo experimental. Após o período de pré-incubação com KRB (30 minutos a 37°C) as fatias foram submetidas a 1h com glutamato 10mM. Após esse período o meio foi substituído por meio de cultura sem glutamato e mantido por 4 horas adicionais. O grupo controle (primeira barra branca) foi considerado como tendo 100% de viabilidade celular. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT. Os valores apresentam a média + desvio padrão de no mínimo 6 experimentos em triplicata (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey). * indica grupos significativamente diferentes do grupo controle (100%), $p < 0,05$. # indica grupos significativamente diferentes do grupo glutamato, $p < 0,05$.

Estudo anterior de nosso grupo de pesquisa demonstrou que, neste protocolo de excitotoxicidade glutamatérgica, o mecanismo de toxicidade induzida por glutamato em fatias hipocâmpais é dependente de alterações no transporte deste neurotransmissor (Molz et al., 2009). Com o objetivo de avaliar a associação entre o efeito neuroprotetor da atorvastatina e da fluoxetina, com a modulação de um dos mecanismos associados à toxicidade glutamatérgica em fatias hipocâmpais, o protocolo de liberação de glutamato foi utilizado.

A Fig. 4 mostra que o tratamento repetido com atorvastatina ou fluoxetina (10mg/kg, 1 vez/dia, 7 dias consecutivos, p.o.), diminui o aumento da liberação de glutamato induzida pela toxicidade glutamatérgica.

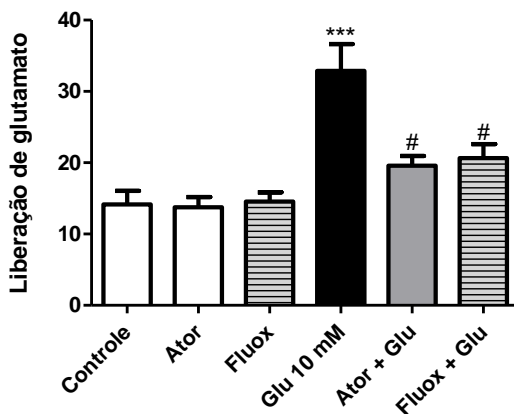


Figura 4. Tratamento subcrônico com atorvastatina reduz a liberação de glutamato induzida pela toxicidade glutamatérgica. Camundongos foram tratados com salina, Atorvastatina (Ator) (10mg/kg, 1 vez/dia, 7 dias consecutivos, p.o.) ou Fluoxetina (Fluox) (10mg/kg, 1 vez/dia, 7 dias consecutivos, p.o.). No oitavo dia os animais foram mortos por decapitação, os hipocâmpos foram obtidos e fatiados. As fatias foram incubadas por 15 minutos com glutamato (Glu) 10 mM. Os grupos controle foram incubados apenas com tampão HBSS- Na^+ e a liberação foi avaliada após incubação com D- $[\text{}^3\text{H}]$ aspartato, medido no sobrenadante por cintilação líquida. As barras representam a média + desvio padrão de 10 experimentos realizados em triplicata (ANOVA de uma via seguida de Duncan). *** indica média diferente dos grupos controle, $P < 0,0001$; # indica média diferente do grupo Glu 10mM, $P < 0,05$.

Uma vez que a administração aguda de atorvastatina (0,1 – 30mg/kg) a camundongos foi capaz de desencadear um efeito tipo-

antidepressivo no TSC e no TNF (Fig.1, parte I), porém foi incapaz de exercer efeito neuroprotetor frente à excitotoxicidade glutamatérgica (*ex vivo* em fatias hipocâmpais e corticais) e considerando que a administração repetida de atorvastatina e também de fluoxetina (10 mg/kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos) foi capaz de prevenir a perda de viabilidade celular desencadeada pela incubação das fatias hipocâmpais com glutamato 10mM, avaliou-se se o mesmo tratamento seria capaz de desencadear um efeito tipo-antidepressivo no TSC.

A Fig. 5 mostra que o tratamento repetido com atorvastatina, (1 e 10mg/kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos), bem como com fluoxetina (10mg/kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos) foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade no TSC (A), sem alterar o número de cruzamentos no TCA (B), caracterizando um efeito tipo-antidepressivo da administração subcrônica da atorvastatina.

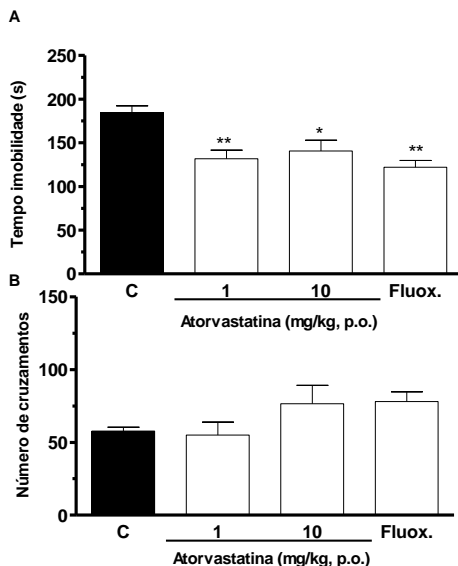


Figura 5. Efeito tipo-antidepressivo do tratamento subcrônico de atorvastatina em camundongos no TSC. O efeito da administração oral de atorvastatina (1 e 10 mg/kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos), bem como de fluoxetina (10mg/kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos) no tempo de imobilidade no TSC (A) e no número de cruzamentos no TCA (B) em camundongos. Atorvastatina (p.o.) foi administrada utilizando a técnica de gavagem na dose de 1 ou 10 mg/kg, uma vez ao dia por um período de 7 dias consecutivos. Fluoxetina (10mg/kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos) foi utilizada como controle positivo. Valores são expressos como média + erro padrão (n=10). *indica grupos significativamente diferentes do grupo controle $p < 0,05$ e ** indica $p < 0,01$ (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

5 DISCUSSÃO

Os efeitos pleiotrópicos das estatinas no SNC já foram evidenciados por uma série de estudos (Kureishi et al., 2000; Vaughan, 2003; Young-Xu et al., 2003; Liao e Laufs, 2005; Miida et al., 2007). Em concordância, parece existir uma relação entre a utilização dessa classe de medicamentos e o bem-estar psicológico de pacientes com depressão (Liao e Laufs, 2005) e ansiedade (Young-Xu et al., 2003). Dentre as estatinas disponíveis para utilização, a atorvastatina é uma estatina sintética e lipossolúvel que desencadeia efeitos colaterais bem tolerados (Schachter, 2004) e apresenta segurança de utilização em altas doses (Schwartz et al., 2001; Koren, Hunninghake, 2004). Apoiado nessas evidências avaliou-se o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina utilizando modelos animais preditivos para avaliação de fármacos com atividade antidepressiva.

O TNF e o TSC são testes comportamentais largamente utilizados no *screening* de novas drogas com atividade antidepressiva (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985). O TSC é considerado menos estressante que o TNF e parece apresentar melhor sensibilidade farmacológica a baixas doses de substâncias com atividade antidepressiva. Uma única administração de atorvastatina p.o. (0,1, 1,0, 10,0 e 30,0 mg/kg) desencadeou um efeito tipo-antidepressivo no TNF (Fig. 1A, parte I) e no TSC (Fig. 1C, parte I), sem alterar a atividade locomotora dos animais (Figs. 1B e 1D, parte I). A dose de 0,01 mg/kg, p.o. não foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade dos animais nem no TNF nem no TSC, sendo portanto considerada a dose sub-efetiva. O efeito tipo-antidepressivo desencadeado é dose dependente e mantido por um período de 4 horas após a sua administração (Fig. 2A, parte I), sem alterar a atividade locomotora em nenhum dos tempos testados (Fig. 2B, parte I). Já foi demonstrado que em roedores a atorvastatina apresenta pico plasmático máximo após 1 hora da sua administração (Black et al., 1998). Em humanos o pico plasmático da atorvastatina dá-se após 1-2 horas da ingestão, o tempo de meia-vida é de 14 horas, e ela é rapidamente absorvida (Drug Bank, 2011).

Considerando que estudos apontam o envolvimento da excitotoxicidade glutamérgica na neurobiologia da depressão (Kugaya e Sanacora, 2005; Sanacora et al., 2012) e ainda que drogas que atuam modulando este sistema podem desencadear efeitos antidepressivos bastante expressivos tanto em animais quanto em humanos (Sanacora et al., 2008), avaliou-se a participação da via L-arginina-NO-GCs-GMPc no efeito desencadeado pela atorvastatina no TSC (parte I).

A administração de NMDA foi capaz de reverter o efeito da atorvastatina em diminuir o tempo de imobilidade dos animais no TSC, o que sugere uma dependência dos receptores NMDA neste efeito, embora o mecanismo de interação entre a atorvastatina e os receptores NMDA não tenha sido ainda elucidado. Em concordância, a co-administração de um antagonista de receptor NMDA, o MK-801 e a atorvastatina, ambos em doses sub-efetivas, produziu um efeito tipo-antidepressivo (Fig. 3, parte I). Estudos prévios já demonstraram que as estatinas protegem culturas de neurônios da morte celular desencadeada pela excessiva estimulação de receptores NMDA (Bosel et al., 2005). Dados do nosso grupo também demonstraram o efeito neuroprotetor da atorvastatina frente a convulsões desencadeadas pelo ácido quinolínico, um agonista do receptor NMDA (Piermartiri et al., 2009). Ainda, a atorvastatina preveniu a degeneração celular induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀, reduzindo as respostas inflamatórias e oxidativas e aumentando a expressão de transportadores gliais de glutamato (Piermartiri et al., 2010). Desta forma, outros estudos já haviam demonstrado uma correlação entre os efeitos da atorvastatina e a modulação do sistema glutamatérgico.

Além disso, dados da literatura já relataram que a co-administração de antagonistas do receptor NMDA como a amantadina e memantina, com antidepressivos clássicos como a fluoxetina, venlafaxina e imiprimina resultou em efeito tipo-antidepressivo, observado pela diminuição do tempo de imobilidade de ratos submetidos ao TNF (Rogóz et al., 2002), mostrando uma importante relação entre o sistema glutamatérgico e o sistema monoaminérgico, e talvez uma possível estratégica de tratamento a ser utilizada.

O hipocampo de humanos contém uma alta densidade de receptores NMDA e neurônios expressando a NOSn, sugerindo a existência de uma via de transdução entre receptores NMDA e NO, via esta que pode estar envolvida na patogênese da depressão e no mecanismo de ação dos antidepressivos (Paul e Skolnick, 2003). Uma vez ativado, os receptores NMDA permitem o aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺, a ligação deste com a calmodulina e a formação de NO através da atividade de NOSn (Esplugues et al., 2002). A estreita relação entre os receptores NMDA e o NO, e também os efeitos tipo-antidepressivo de antagonistas de NMDA levaram a estudos do efeito antidepressivo de inibidores da NOS. Dados recentes apontaram a modulação da via L-arginina-NO-GMPc por compostos com atividade tipo-antidepressiva (Zomkowski et al., 2010; Moretti et al., 2011; Zeni et al., 2011). Em humanos, o azul de metileno, um inibidor da NOS,

apresentou-se como estratégia antidepressiva em pacientes com depressão maior (Naylor et al., 1987).

O pré-tratamento dos animais com L-arginina (substrato da NOS) foi capaz de reverter a redução do tempo de imobilidade desencadeado pela atorvastatina no TSC (Fig. 4, parte I). Estes resultados indicam que o efeito da atorvastatina pode depender pelo menos em parte da inibição da síntese do NO. Estratégias antidepressivas clássicas como a desipramina, fluoxetina e moclobemida foram capazes de reverter a lesão induzida por NMDA em células PC12, e também inibir a via de sinalização NMDA-NO (Li et al., 2006). Esses relatos são consistentes com a idéia de que antidepressivos utilizados na clínica podem compartilhar uma habilidade em bloquear ou reduzir a função do receptor NMDA.

O envolvimento da via L-arginina-NO-GMPc no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina no TSC é reforçado pelo fato de que uma dose sub-efetiva de 7-nitroindazol (inibidor específico de NOSn), azul de metileno (inibidor da NOS e da GCs) ou ODQ (inibidor específico da GCs), desencadearam um efeito tipo-antidepressivo em combinação com uma dose sub-efetiva de atorvastatina (Fig. 5, parte I). Níveis aumentados de GMPc e uma diminuição na expressão genética de PDE foram observados no hipocampo de ratos submetidos ao tratamento crônico com fluoxetina e imipramina (Reierson et al., 2009). Portanto, o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina pode ser mediado pela redução de GMPc, como uma consequência da redução da síntese de NO. Em concordância, o pré-tratamento dos animais com sildenafil (inibidor da PDE tipo 5, que aumenta os níveis de GMPc) reverteu o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina (Fig. 6, parte I). Esses dados reforçam a hipótese de que a administração de atorvastatina produz uma redução nos níveis de GMPc, e que este pode ser um importante alvo no efeito desencadeado pela atorvastatina no TSC.

O BDNF é um fator neurotrófico envolvido na plasticidade neuronal (Jin et al., 2002). Um estudo clínico que mensurou os níveis séricos de BDNF em pacientes com depressão não tratada, mostrou que os níveis desta neurotrofina estavam significativamente menores quando comparados com os níveis de BDNF de um grupo de participantes saudáveis (Gonul et al., 2005). Já foi proposto que as estatinas podem aumentar a clivagem do pro-BDNF a BDNF, uma vez que ativam a proteína ativadora de plasminogênio tecidual (tPA), o que pode resultar em efeito tipo-antidepressivo (Tsai et al., 2007). Considerando esta suposição, os níveis hipocâmpais de BDNF, em animais tratados agudamente com atorvastatina foi avaliado. A atorvastatina foi capaz de

aumentar, após uma única administração, os níveis hipocampais de BDNF (Fig. 7, parte I). Dados prévios da literatura demonstraram que um tratamento mais prolongado com atorvastatina (14 dias) levou ao aumento dos níveis de BDNF em camundongos submetidos a um modelo de isquemia cerebral (Chen et al., 2005). Resultados comparáveis foram demonstrados com ratos tratados com simvastatina pelo mesmo período de tempo, onde o aumento dos níveis de BDNF foi observado após trauma encefálico (Wu et al., 2008). Contudo, esta é a primeira vez que o aumento dos níveis de BDNF hipocampal, em consequência de uma administração única de atorvastatina foi demonstrado.

Como comentado anteriormente os agentes moduladores do sistema glutamatérgico, em particular a ketamina, um antagonista de receptores NMDA, tem sido propostos como substâncias capazes de induzir um rápido efeito antidepressivo tanto em animais como em humanos (Li et al., 2010). Ainda, a administração aguda de ketamina induz um efeito tipo-antidepressivo e aumento dos níveis de BDNF em ratos (Garcia et al., 2008). Corroborando com esta idéia, um trabalho recente do nosso grupo demonstrou que o extrato aquoso da *Aloysia gratissima* desencadeia um efeito tipo antidepressivo através da modulação da via L-arginina-NO-GMPc, e da prevenção da excitotoxicidade glutamatérgica em fatias hipocampais de camundongos (Zeni et al., 2011), o que fornece uma evidência para a relação entre o efeito tipo-antidepressivo e neuroproteção. Neste trabalho, a atorvastatina induziu um efeito tipo-antidepressivo em camundongos via modulação dos receptores NMDA e aumento dos níveis hipocampais de BDNF. Desta forma, o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina pode ser correlacionado com sua ação neuroprotetora, uma vez que ela modula a transmissão glutamatérgica e aumenta os níveis de um fator neurotrófico relacionado com sobrevivência neural. Considerando que a infusão intraventricular ou intrahipocampal aguda de BDNF desencadeia um efeito tipo-antidepressivo rápido (Shirayama et al., 2002; Hoshaw et al., 2005) e que a administração aguda de ketamina é capaz de desencadear um efeito antidepressivo sustentado por aumentar os níveis de BDNF (Monteggia et al., 2004), sugere-se que possivelmente a atorvastatina promova efeito antidepressivo rápido.

A segunda parte dos resultados explora de forma mais detalhada a relação entre o efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor da atorvastatina, utilizando um protocolo de toxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo e córtex frontal. O hipocampo é uma das estruturas cerebrais mais suscetíveis à excitotoxicidade, e estudos demonstraram

uma redução do volume hipocampal em pacientes com depressão, redução esta que pode ser correlacionada com a duração da doença (Koolschijn et al., 2009). Além do hipocampo, regiões do encéfalo como o córtex pré-frontal estão envolvidas no processamento da emoção e na integração desta com a cognição e as funções viscerais (Frangou, 2006). A depressão está associada a alterações morfológicas dessas regiões, como atrofia, vulnerabilidade seletiva a morte celular de neurônios regionais, alterações neuroquímicas, mudanças na sinalização intracelular e na expressão gênica (Tsankova et al., 2007). Já foi demonstrado que concentrações milimolares de glutamato podem induzir excitotoxicidade aguda em fatias de hipocampo e assim promover uma redução na viabilidade celular. Essa perda de viabilidade celular induzida por glutamato ocorre através da ativação de receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato, da reversão de transportadores glutamatérgicos, além da ativação de vias de sinalização das MAP cinases, que ativam a proteína p38^{MAPK} (Molz et al., 2008). Fatias de tecido apresentam vantagens em relação a outros modelos *in vitro* pelo fato de que mantêm a citoarquitetura do tecido de origem, visto que preservam as interações neurônio-glia (Gahwiler et al., 1997).

Inicialmente, a validade do protocolo de toxicidade glutamatérgica *in vitro* proposto por Molz e colaboradores (2008) para fatias de hipocampo de ratos jovens foi avaliada para fatias de hipocampo de camundongos adultos. Demonstrou-se que a incubação das fatias hipocampais com glutamato 10 mM por 1 hora seguida de um período de incubação de 4 horas com meio de cultura, diminuiu de maneira mais significativa a viabilidade celular, sendo este o protocolo utilizado para a indução de toxicidade por glutamato (Fig.1 parte II).

Este estudo avaliou os efeitos da administração aguda de atorvastatina frente à toxicidade glutamatérgica induzida em fatias hipocampais e de córtices frontais de camundongos. A administração aguda de atorvastatina não foi capaz de prevenir a perda da viabilidade celular induzida por glutamato nas fatias hipocampais, nem tão pouco nas fatias de córtex frontal. Apesar deste fato, foi demonstrado que a atorvastatina desencadeia um efeito tipo-antidepressivo no TSC e no TNF, e aumenta os níveis hipocampais de BDNF (parte I). Utilizou-se, portanto, a fluoxetina, um antidepressivo clássico inibidor seletivo da recaptação de serotonina, que apresenta efeito antidepressivo bem estabelecido em animais (10mg/kg, p.o., TSC) e humanos como controle positivo. A administração aguda de fluoxetina também foi incapaz de prevenir a perda da viabilidade celular induzida por glutamato tanto nas fatias de hipocampo como nas fatias de córtex frontal (Fig.2 parte II).

Desta forma, tanto a atorvastatina como a fluoxetina apresentaram efeito tipo-antidepressivo, porém, foram incapazes de prevenir a perda de viabilidade celular desencadeada pela incubação com glutamato.

Os efeitos neuroprotetores da atorvastatina demonstrados em estudos anteriores foram avaliados após o uso repetido da mesma. A exposição de neurônios corticais a atorvastatina por 2 a 4 dias consecutivos, preveniu a morte celular induzida por NMDA (Zacco et al., 2003; Ponce et al., 2011) e também da toxicidade induzida por glutamato (Bosel et al., 2005). Além disso, dados do grupo demonstraram que a administração repetida de atorvastatina (10 mg/kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos) preveniu a morte celular induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ (Piermartiri et al., 2010), além de prevenir convulsões desencadeadas pelo ácido quinolínico (Piermartiri et al., 2009).

Considerando o exposto acima, avaliou-se o efeito neuroprotetor da administração repetida de atorvastatina a camundongos, através de uma abordagem *ex vivo*, onde fatias de hipocampo e de córtex frontal foram submetidas à toxicidade glutamatérgica. Fluoxetina (10mg/Kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos) foi utilizada como controle positivo. A atorvastatina foi capaz de prevenir a perda da viabilidade celular induzida por glutamato nas fatias de hipocampo, porém não nas fatias de córtex frontal. A atividade neuroprotetora apresentou-se como dose-dependente. De forma semelhante a fluoxetina apresentou atividade neuroprotetora frente à toxicidade induzida por glutamato nas fatias hipocampais, porém não nas fatias corticais (Fig. 3 parte II). O mecanismo pelo qual áreas específicas do encéfalo, como o hipocampo, são mais vulneráveis à excitotoxicidade é desconhecido (Wang et al., 2000) e as propriedades neuronais intrínsecas nessas áreas podem favorecer o desbalanço na sinapse excitatória. A neuroproteção regional, já foi demonstrada em trabalhos anteriores. O MK-801, um antagonista do receptor NMDA, foi capaz de reduzir a morte celular induzida por um modelo de isquemia cerebral com diferentes seletividades no estriado, córtex e hipocampo (Warner et al., 1991). De forma semelhante, trabalhos relatam o efeito neuroprotetor de diferentes estatinas no hipocampo de roedores, frente à epilepsia induzida por pilocarpina (Rangel et al., 2005), através da diminuição de citocinas inflamatórias (Gouveia et al., 2011); frente ao trauma encefálico através do aumento de BDNF, ativação da via PI3K/Akt e da neurogênese no giro denteado (Wu et al., 2008); frente à convulsões induzidas por ácido quinolínico através do aumento da captação de glutamato (Piermartiri et al., 2009); e ainda frente à morte celular, estresse oxidativo e inflamação

hipocampal induzida por peptídeo A β ₁₋₄₀ (Piermartiri et al., 2010). Em concordância, em uma análise *ex vivo*, Mallei e colaboradores (2002) observaram que o tratamento crônico de ratos por 21 dias com fluoxetina, leva ao aumento dos níveis de FGF2, um fator neurotrófico relacionado à sobrevivência neuronal, preferencialmente no hipocampo e não no córtex. O mesmo grupo ainda especula que antidepressivos que atuam regulando o sistema serotoninérgico induzem ao aumento de FGF2 no hipocampo, enquanto antidepressivos que atuam modulando o sistema noradrenérgico atuam induzindo o aumento deste fator neurotrófico preferencialmente a nível cortical. Ainda, o tratamento repetido com fluoxetina (21 dias) preveniu a morte celular hipocampal e estriatal induzida por dexametasona em ratos (Haynes et al., 2004). Corroborando com esses dados, o tratamento com fluoxetina pelo mesmo período de tempo levou ao aumento dos níveis de BDNF e a neurogênese no hipocampo, o que não acontece na medula espinhal (Engesser-Cesar et al., 2007).

Um grande número de estudos tem demonstrado que a administração repetida de agentes antidepressivos pode reduzir a liberação pré-sináptica de glutamato o que resulta em neuroproteção (Sanacora et al., 2012). A liberação de glutamato ocorre tanto por neurônios pré-sinápticos, através da exocitose cálcio-dependente, como também por astrócitos, regulando a atividade neuronal. A liberação astrocitária de glutamato pode ocorrer através de diversos mecanismos, dentre eles: (I) reversão dos transportadores de glutamato e (II) exocitose dependente de íons Ca²⁺ (Malarkey e Parpura, 2008). Quando a reversão dos transportadores de glutamato ocorre, o glutamato em vez de ser captado é liberado para o meio, o que aumenta a concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica aumentando conseqüentemente o dano celular (Camacho e Massieu, 2006). Existe uma correlação direta entre a disfunção dos transportadores de glutamato, aumento da concentração do neurotransmissor na fenda sináptica e desenvolvimento de dano celular excitotóxico tanto em modelos de estudo *in vivo* como em modelos *in vitro* (Maragakis e Rothstein, 2004).

Tanto a atorvastatina como a fluoxetina (10mg/kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos) diminuíram a liberação de glutamato induzida pela toxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo de camundongos, sem alterar *per se* este parâmetro (Fig.4, parte II). Esta foi a primeira vez que os efeitos da atorvastatina frente à liberação de glutamato foram demonstrados. O tratamento com atorvastatina (10mg/kg, p.o., 1 vez/dia, 7 dias consecutivos) foi previamente avaliado

frente a diminuição da captação de glutamato induzida por ácido quinolínico e pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ (Piermartiri et al., 2009; Piermartiri et al., 2010). Nesta abordagem a atorvastatina aumenta a captação de glutamato, diminuindo, portanto a excitotoxicidade. Uma abordagem semelhante foi realizada por Michael-Titus e colaboradores (2000), que mostraram que a administração repetida (21 dias) de imipramina (antidepressivo tricíclico) ou fenelzina (inibidor da monoamina oxidase) a ratos, foi capaz de reduzir a liberação de glutamato induzida por potássio, em fatias de córtex pré-frontal. Ainda, um estudo utilizando microdialise mostrou que a infusão aguda de desipramina, imipramina (antidepressivos tricíclicos) e citalopram (inibidor seletivo da recaptação de serotonina) no córtex pré-frontal de ratos, diminuiu a liberação de glutamato e aspartato estimulada por veratridina (ativador de canal de sódio) (Golembiowska e Zylewska, 1999). Em outro estudo, o tratamento crônico com desipramina, fluoxetina ou venlafaxina, aboliu completamente a liberação de glutamato aumentado pelo estresse, sugerindo que este mecanismo seja importante para o efeito farmacológico desses antidepressivos (Musazzi et al., 2010). Assim, se substâncias com atividade antidepressiva podem induzir uma diminuição na hiperatividade glutamatérgica em regiões críticas do encéfalo, o seu uso prolongado pode ter um importante potencial neuroprotetor na depressão (Michael-Titus et al., 2000).

A fim de estabelecer a relação entre a atividade neuroprotetora da administração repetida da atorvastatina como seu efeito antidepressivo, utilizou-se o TSC. A fluoxetina foi utilizada como controle positivo. A atorvastatina (1 e 10 mg/kg, p.o.) assim como a fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade dos camundongos no TSC (Fig. 5, parte II), mantendo portanto o efeito tipo-antidepressivo observado com o tratamento agudo (Fig. 1, parte 1). Alguns estudos vêm demonstrando que o efeito neuroprotetor e antidepressivo de muitas substâncias podem ser relacionados. A avaliação dos efeitos neuroprotetores dos antidepressivos tem ocupado um papel central no estudo da patofisiologia da depressão, como também no mecanismo de ação de drogas com atividade antidepressiva (Duman, 2009). O uso de antidepressivos acarreta em efeitos positivos na plasticidade sináptica, aumentando neurotrofinas como o BDNF, que por sua vez estimula o crescimento de neurônios serotoninérgicos no encéfalo de ratos adultos (Altar, 1999; Sairanen et al., 2007). Lim e colaboradores (2009) relataram o efeito neuroprotetor da fluoxetina frente à isquemia cerebral, via modulação da resposta inflamatória. Um dado recente do nosso laboratório mostrou o efeito neuroprotetor frente à toxicidade

glutamatérgica e tipo-antidepressivo da administração aguda do extrato aquoso de *Aloysia gratissima* a camundongos (Zeni et al., 2011). Além disso, os efeitos neuroprotetores da fluoxetina foram relatados por Jin e colaboradores (2009), que mostraram a atividade desse antidepressivo frente à morte celular hipocampal induzida por ácido kaínico.

Assim, pode-se propor através dos dados demonstrados que a administração aguda da atorvastatina desencadeia um efeito tipo-antidepressivo em camundongos que depende pelo menos em parte da modulação do receptor NMDA e da via de sinalização L-arginina-NO-GCs-GMPc. Esse tratamento agudo não foi capaz de prevenir a perda da viabilidade celular desencadeada pela incubação de fatias hipocampais ou corticais com glutamato, porém foi capaz de aumentar os níveis hipocampais de BDNF, mostrando uma possível associação entre o efeito tipo-antidepressivo e o aumento dos níveis de uma neurotrofina. De mesma forma o tratamento repetido com atorvastatina, foi capaz de desencadear um efeito tipo-antidepressivo comparável ao efeito desencadeado pela fluoxetina, um antidepressivo clássico. O efeito antidepressivo, proveniente da administração repetida de atorvastatina assim como da fluoxetina, podem ser associados ao efeito neuroprotetor dependente de dose e região-específica desencadeado por ambas as substâncias frente à toxicidade glutamatérgica. A atividade neuroprotetora da administração repetida da atorvastatina e da fluoxetina a camundongos pode ser devida à diminuição da liberação de glutamato induzida por glutamato em fatias hipocampais.

Desta forma, este estudo demonstrou que a atorvastatina apresenta efeito neuroprotetor e antidepressivo que podem estar associados à modulação dos níveis de glutamato extracelular e ao aumento dos níveis de uma neurotrofina.

6 CONCLUSÃO

- ✓ A administração aguda de atorvastatina (p.o.) em camundongos desencadeia efeito tipo-antidepressivo no TNF e no TSC, dois modelos preditivos para avaliação de fármacos com atividade antidepressiva;
- ✓ O efeito tipo-antidepressivo da administração aguda de atorvastatina (p.o.) em camundongos depende da modulação do receptor NMDA e da via de sinalização L-arginina-NO-GCs-GMPc, além do aumento dos níveis hipocampais de BDNF;
- ✓ A administração aguda de atorvastatina (p.o.) em camundongos não foi capaz de prevenir a morte celular desencadeada pela incubação de fatias de hipocampo ou de córtex frontal com glutamato (*ex vivo*);
- ✓ O tratamento repetido dos camundongos com atorvastatina (p.o.) preveniu a perda da viabilidade celular em fatias de hipocampo, porém não de córtex frontal, submetidas a toxicidade glutamatérgica, via diminuição da liberação de glutamato induzida por glutamato (*ex vivo*). Este efeito também foi observado pela administração repetida de fluoxetina (p.o.) a camundongos;
- ✓ O efeito tipo-antidepressivo no TSC da administração repetida de atorvastatina (p.o.) a camundongos é comparável ao efeito desencadeado pelo tratamento repetido (p.o.) com fluoxetina, e este efeito pode ser associado ao efeito neuroprotetor desencadeado pelo mesmo tratamento frente à toxicidade glutamatérgica.

REFERÊNCIAS

- Aarts, M.; Liu, Y.; Liu, L.; Besshoh, S.; Arundine, M.; Gurd, J.W.; Wang, Y.T.; Salter, M.W.; Tymianski, M. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. **Science**, v.25, p.846-850, 2002.
- Altamura, C. A.; Mauri, M.C.; Ferrara, A.; Moro, A.R.; D'Andrea, G.; Zamberlan, F. Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatric disorders. **Am. J. Psychiatry**. v. 150, p.1731–1733, 1993.
- Altar, C.A. Neurotrophins and depression. **Trends Pharmacol Sci**, v.20, p.59–61, 1999.
- Ansorge, M.S.; Hen, R.; Gingrich, J.A. Neurodevelopmental origins of depressive disorders. **Curr Opin Pharmacol**. v.7, p.8-17, 2007.
- Autry, A.E.; Adachi, M.; Nosyreva, E.; Na, E.S.; Los, M.F.; Cheng, P.F.; Kavalali, E.T.; Monteggia, L.M. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. **Nature**. v.475, p.91-95, 2011.
- Baker, A.J.; Moulton, R.J.; MacMillan, V.H.; Shedden, P.M. Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid following traumatic brain injury in humans. **J Neurosurg**. v.79, p.369-372, 1993.
- Berman, R.M.; Cappiello, A.; Anand, A.; Oren, D.A.; Heninger, G.R.; Charney, D.S.; Krystal, J.H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry**. v.15, p.351-354, 2000.
- Black, A.E.; Sinz, M.W.; Haynes, R.N.; Woolf, T.F. Metabolism and excretion in mouse after single and multiple oral doses of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. **Drug metabolism and disposition**. v.26, p. 755-763, 1998.
- Boll, M.C.; Alcaraz-Zubeldia, M.; Rios, C. Medical management of Parkinson's disease: focus on neuroprotection. **Curr Neuropharmacol**. v.9, p.350-359, 2011.

Bonanno, G.; Giambelli, R.; Raiteri, L.; Tiraboschi, E.; Zappettini, S.; Musazzi, L.; Raiteri, M.; Racagni, G.; Popoli, M. Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. **J Neurosci.** v.30, p.3270-3279, 2005.

Bosel, J.; Gandor, F.; Harms, C.; Synowitz, M.; Harms Djoufack, P. C.; Megow, D.; Dirnagl, U.; Hortnagl, H.; Fink, K. B.; Endres, M. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate induced excitotoxicity in primary cortical neurons. **Journal of Neurochemistry.** v.92, p.1386-1398, 2005.

Bowden, C.L.; Calabrese, J.R.; Sachs, G.; Yatham, L.N.; Asghar, S.A.; Hompland, M.; Montgomery, P.; Earl, N.; Smoot, T.M.; DeVeaugh-Geiss, J. A placebo-controlled 18-month trial of lamotrigine and lithium maintenance treatment in recently manic or hypomanic patients with bipolar I disorder. **Arch Gen Psychiatry.** v.60, p.392-400, 2003.

Bunn, S.J.; Sim, A.T.; Herd, L.M.; Austin, L.M.; Dunkley, P.R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of intracellular Ca^{2+} in the histamine H1 receptor-stimulated phosphorylation of Ser8, Ser19, Ser31, and Ser40. **J Neurochem.** v.64, p.1370-1378, 1995.

Carvalho, A.L.; Caldeira, M.V.; Santos, S.D.; Duarte, C.B. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. **Br J Pharmacol.** v.153, suppl. p.310-324, 2008.

Cassano, T.; Serviddio, G.; Gaetani, S.; Romano, A.; Dipasquale, P.; Cianci, S.; Bellanti, F.; Laconca, L.; Romano, A.D.; Padalino, I.; Laferla, F.M.; Nicoletti, F.; Cuomo, V.; Vendemiale, G. Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. **Neurobiol Aging.** 2011 [Epub ahead of print].

Chaki, S.; Yoshikawa, R.; Hirota, S.; Shimazaki, T.; Maeda, M.; Kawashima, N.; Yoshimizu, T.; Yasuhara, A.; Sakagami, K.; Okuyama, S.; Nakanishi, S.; Nakazato, A. MGS0039: a potent and selective group II metabotropic glutamate receptor antagonist with antidepressant-like activity. **Neuropharmacology.** v.46, p.457-467, 2004.

Camacho, A.; Massieu, L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. **Arch Med. Res.** v. 37, p.11-18, 2006.

Chan, J.P.; Unger, T.J.; Byrnes, J.; Rios, M. Examination of behavioral deficits triggered by targeting Bdnf in fetal or postnatal brains of mice. **Neuroscience.** v.29, p.49-58, 2006.

Chen, J.; Chunling, Z.; Hao, J.; Yi, L.; Lijie, Z.; Adam, R.; Mark, K.; Mei, L.; Michael, C. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. **J Cereb Blood Flow Metab.** v.25, p.281-290, 2005.

Chen, L.; Liu, J.; Ali, U.; Gui, Z.H.; Hou, C.; Fan, L.L.; Wang, Y.; Wang, T. Chronic, systemic treatment with a metabotropic glutamate receptor 5 antagonist produces anxiolytic-like effects and reverses abnormal firing activity of projection neurons in the basolateral nucleus of the amygdala in rats with bilateral 6-OHDA lesions. **Brain Res Bull.** v.28, p. 215-223, 2011.

Choi, D.W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. **Neurosci Lett.** v.58, p.293-297, 1985.

Choudary, P.V.; Molnar, M.; Evans, S.J.; Tomita, H.; Li, J.Z.; Vawter, M.P.; Myers, R.M.; Bunney, W.E. Jr.; Akil, H.; Watson, S.J.; Jones, E.G. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. **Proc Natl Acad Sci.** v.43, p.15653-15658, 2005.

Conn, P. J.; Pin, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v.37, p.205-237, 1997.

Coppen, A. The biochemistry of affective disorders. **Br J Psychiatry.** v.113, p.1237-1264, 1967.

Corsini, A.; Bellosta, S.; Baetta, R.; Fumagalli, R.; Paoletti, R.; Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacol. Ther.** v.84, p.413-428, 1999.

Curtis, D.R.; Watkins, J.C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. **J Neurochem.** v.6, p.117-141, 1960.

Danbolt, N. C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.** v.65, p. 1–105, 2001.

Dhir, A.; Kulkarni, S.K. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide**, v.24, p.125–131, 2011.

DiazGranados, N.; Ibrahim, L.A.; Brutsche, N.E.; Ameli, R.; Henter, I.D.; Luckenbaugh, D.A.; Machado-Vieira, R.; Zarate, C.A. Jr. Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder. **J Clin Psychiatry.** v.71, p.1605-1611, 2010.

Duman, R.S. Neurochemical theories of depression: preclinical studies. In: Charney, D.S.; Nestler, E.J., editors. **Neurobiology of mental illness.** 3rd ed. New York: Oxford University Press; p.414, 2009.

Drug Bank, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00857>, acesso em 09-11-2011.

Engesser-Cesar, C.; Anderson, A.J.; Cotman, C.W. Wheel running and fluoxetine antidepressant treatment have differential effects in the hippocampus and the spinal cord. **Neuroscience.** v.3, 1033-1044, 2007.

Esplugues, J.V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Brit. J. Pharmacol.** v.135, p.1079–1095, 2002.

Faden, A.I.; Demediuk, P.; Panter, S.S.; Vink, R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. **Science.** v.19, p.798-800, 1989.

Featherstone, D.E. Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. **ACS Chemical Neuroscience**, v.1, p.4-12, 2010.

Ferszt, R.; Kühl, K.P.; Bode, L.; Severus, E.W.; Winzer, B.; Berghöfer, A.; Beelitz, G.; Brodhun, B.; Müller-Oerlinghausen, B.; Ludwig, H. Amantadine revisited: an open trial of amantadinesulfate treatment in chronically depressed patients with Borna disease virus infection.

Pharmacopsychiatry. v.32, p.142-147, 1999.

Francis, P. T.; Poynton, A.; Lowe, S.L.; Najlerahim, A.; Bridges, P.K.; Bartlett, J.R.; Procter, A.W.; Bruton, C.J.; Bowen, D.M. Brain amino acid concentrations and Ca²⁺-dependent release in intractable depression assessed antemortem. **Brain Res.** v. 494, p.315–324, 1989.

Frangou, S. Functional neuroimaging in mood disorders. **Psychiatry.** v.5, p.176-179, 2006.

Frye, M. A.; Tsai, G. E.; Huggins, T.; Coyle, J. T.; Post, R. M. Low cerebrospinal fluid glutamate and glycine in refractory affective disorder. **Biol. Psychiatry.** v.61, p.162–166, 2006.

Gahwiler, B.H.; Capogna, M.; Debanne, D.; McKinney, R.A.; Thompson, S. M. Organotypic slices cultures: A technique has come of age. **Trends Neurosci.**, v.20, p.471-477, 1997.

Garcia, L.S.; Comim, C.M.; Valvassori, S.S.; Réus, G.Z.; Barbosa, L.M.; Andreazza, A.C.; Stertz, L.; Fries, G.R.; Gavioli, E.C.; Kapczinski, F.; Quevedo, J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v.32, p.140-144, 2008.

Gaw, A.; Packard, C.J. At what level of coronary heart disease risk should a statin be prescribed? **Curr Opin Lipidol.** v.11, p363-367, 2000.

Germershausen, J.I.; Hunt, V.M.; Bostedor, R.G.; Bailey, P.J.; Karkas, J.D.; Alberts, A.W. Tissue selectivity of the cholesterol-lowering agents lovastatin, simvastatin and pravastatin in rats in vivo. **Biochem Biophys Res Commun.** v.15, p.667-675, 1989.

Ginsberg, S.D.; Hemby, S.E.; Smiley, J.F. Expression profiling in neuropsychiatric disorders: Emphasis on glutamate receptors in bipolar disorder. **Pharmacol Biochem Behav.** v.100, p.705-711, 2011.

Goldstein, J.L.; Brown, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**. v.343, 425–430, 1990.

Gołombiowska, K.; Zylewska, A. Effect of antidepressant drugs on veratridine-evoked glutamate and aspartate release in rat prefrontal cortex. **Pol J Pharmacol**. v.1, p.63-70, 1999.

Gomes, R.A.; Hampton, C.; El-Sabeawy, F.; Sabo, S.L.; McAllister, A.K. The dynamic distribution of TrkB receptors before, during, and after synapse formation between cortical neurons. **J Neurosci**. v. 26, p.11487–11500, 2006.

Gonul, A.S.; Akdeniz, F.; Taneli, F.; Donat, O.; Eker, C.; Vahip, S. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**. v.255, p.381-386, 2005.

Görtelmeyer, R.; Erbler, H. Memantine in the treatment of mild to moderate dementia syndrome. A double-blind placebo-controlled study. **Arzneimittelforschung**. v.42, p.904-913, 1992.

Gouveia, T.L.F.; Scorza, F.A.; Silva, M.J.V.; Bandeira, T.A.; Perosa, S.R.; Argañaraz, G.A.; Silva, M.P.S.; Araujo, T.R.; Frangiotti, M.I.B.; Amado, D.; Cavalheiro, E.A.; Silva, J.A.; Naffah-Mazzacoratti, M.G. Lovastatin decreases the synthesis of inflammatory mediators in the hippocampus and blocks the hyperthermia of rats submitted to long-lasting status epilepticus. **Epilepsy and Behavior**, v. 20, p. 1-5, 2011.

Hall, A. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. **Science**, v.280, p.2074-2075, 1998.

Hara, M.R.; Snider, S.H. Cell signaling and neuronal death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 47, p. 117–41, 2007.

Haynes, L.E.; Barber, D.; Mitchell, I.J. Chronic antidepressant medication attenuates dexamethasone-induced neuronal death and sublethal neuronal damage in the hippocampus and striatum. **Brain Res**.v.12, p.157-167, 2004.

Heiberg, I.L.; Wegener, G.; Rosenberg, R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. **Behav Brain Res.** v.21, p.479-484, 2002.

Heldt, S.A.; Stanek, L.; Chhatwal, J.P.; Ressler, K.J. Hippocampus specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. **Mol Psychiatry**, v.12, p.656–670, 2007.

Hobbs, H.H.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolaemia. **Hum. Mutat.** v.1, p.445–466, 1992.

Hoshaw, B.A.; Malberg, J.E.; Lucki, I. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. **Brain Res.** v.1, p.204-208, 2005.

Hurley, S.C. Lamotrigine update and its use in mood disorders. **Ann Pharmacother.** v.36, p.860-873, 2002.

Istvan, E.S.; Deisenhofer, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. **Science**, v.292, p.1160–1164, 2001.

Jacobsson, S.O.; Fowler, C.J. Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephalic cells: effects of NMDA antagonists, antioxidants and MAO inhibitors. **Neurochem Int.** v.34, p.49 – 62, 1999.

Jin, Y.; Fischer, I.; Tessler, A.; Joule, J.D. Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote axonal regeneration from supraspinal neurons following chronic spinal cord injury. **Exp Neurol.** v.1, p.265-275, 2002.

Jin, Y.; Lim, C.M.; Kim, S.W.; Park, J.Y.; Seo, J.S.; Han, P.L.; Yoon, S.H.; Lee, J.K. Fluoxetine attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. **Brain Res.** v.24, p.108-116, 2009.

Jorgensen, M.B.; Diemer, N.H. Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat: possible role of transmitter glutamate. **Acta Neurol Scand.** v.66, p.536-546, 1982.

Karolewicz, B.; Stockmeier, C.; Ordway, G.A. Elevated levels of the NR2C subunit of the NMDA receptor in the locus coeruleus in depression. **Neuropsychopharmacology**. 2005 [Epub ahead of print].

Kaster, M.P., Rosa, A.O., Santos, A.R., Rodrigues, A.L. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressantlike effects of adenosine in the forced swimming test. *Int. J. Neuropsychopharmacology*. v.8, p.601–606, 2005.

Kenny, P.J., Markou, A. The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v 25, p. 265-272, 2004.

Kew, J. N.; Kemp, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, v.179, p.4–29, 2006.

Koolschijn, P.C.; van Haren, N.E.; Lensvelt-Mulders, G.J.; Hulshoff Pol, H.E.; Kahn, R.S. Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a metaanalysis of magnetic resonance imaging studies. **Hum Brain Mapp**. v.30, p.3719-3735, 2009.

Koponen, E.; Voikar, V.; Riekk, R.; Saarelainen, T.; Rauramaa, T.; Rauvala, H.; Taira, T.; Castrén, E. Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor TrkB exhibit increased activation of the TrkB–PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. **Mol Cell Neurosci**. v. 26, p. 166–181, 2004.

Koren, M.J.; Hunninghake, D.B. Clinical outcomes in managed-care patients with coronary heart disease treated aggressively in lipid-lowering disease management clinics: the alliance study. **J Am Coll Cardiol**. v.9, p.1772-1779, 2004.

Koura, S.S.; Doppenberg, E.M.; Marmarou, A.; Choi, S.; Young, H.F.; Bullock, R. Relationship between excitatory amino acid release and outcome after severe human head injury. **Acta Neurochir Suppl**. v.71, 244-246, 1998.

Krnjevic, K.; Phillis, J.W. Actions of certain amines on cerebral cortical neurones. **Br J Pharmacol Chemother**. v.20, p.471-90, 1963.

Küçükibrahimoğlu, E.; Saygin, M.Z.; Calışkan, M.; Kaplan, O.K.; Unsal, C.; Gören, M.Z. The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine- or S-citalopram-treated female patients with major depression. **Eur J Clin Pharmacol**. v.65, p.571-577, 2009.

Kudoh, A.; Takahira, Y.; Katagai, H.; Takazawa, T. Small-dose ketamine improves the postoperative state of depressed patients. **Anesth Analg**. v.95, p.114-118, 2002

Kugaya, A.; Sanacora, G. Beyond monoamines: Glutamatergic function in mood disorders. **CNS Spectrums**, v.10, p.808-819, 2005.

Kureishi, Y.; Luo, Z.; Shiojima, I.; Bialik, A.; Fulton, D.; Lefer, D.J.; Sessa, W.C.; Walsh, K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nat. Med**. v.6, p.1004–1010, 2003.

Lanni, C.; Govoni, E.S.; Lucchelli, E.A.; Boselli, E.C. Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, p.2985–3008, 2009.

Lau, A.; Tymianski, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflugers Arch**. v.460, 525-542, 2010.

Lee, B.H.; Kim, H.; Park, S.H.; Kim, Y.K. Decreased plasma BDNF level in depressive patients. **J Affect Disord**. v.101, p.239-244, 2007.

Levine, J.; Panchalingam, K.; Rapoport, A.; Gershon, S.; McClure, R.J.; Pettegrew, J.W. Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. **Biol. Psychiatry**. v. 47, p.586–593, 2000.

Li, Y.F.; Zhang, Y.Z.; Liu, Y.Q.; Wang, H.L.; Cao, J.B.; Guan, T.T.; Luo, Z.P. Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function appears to be one of the common actions for antidepressants. **J Psychopharmacol**. v.20, p.629-635, 2006.

Li, N.; Lee, B.; Liu, R.J.; Banasr, M.; Dwyer, J.M.; Iwata, M.; Li, X.Y.; Aghajanian, G.; Duman, R.S. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v.329, p.959-964, 2010.

Liao, J. K.; Laufs, U. Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v.45, p. 89-118, 2005.

Lim, C.M.; Kim, S.W.; Park, J.Y.; Kim, C.; Yoon, S.H.; Lee, J.K. Fluoxetine affords robust neuroprotection in the postischemic brain via its anti-inflammatory effect. **J Neurosci Res**. v.87, p.1037-1045, 2009.

Lu, D.; Goussev, A.; Chen, J.; Pannu, P.; Li, Y.; Mahmood, A.; Chopp, M. Atorvastatin Reduces Neurological Deficit and Increases Synaptogenesis, Angiogenesis, and Neuronal Survival in Rats Subjected to Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v.21, p.21-32, 2004

Maes, M.; Verkerk, R.; Vandoollaeghe, E.; Lin, A.; Scharpe, S. Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsivity. **Acta Psychiatr Scand**. v.97, p.302-308, 1998.

Malarkey, M.B.; Parpura, V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. **Neurochem Int**. v. 52, p. 142–154, 2008.

Mallei, A.; Shi, B.; Mocchetti, I. Antidepressant treatments induce the expression of basic fibroblast growth factor in cortical and hippocampal neurons. **Mol Pharmacol**. v.61, p.1017-1024, 2002.

Maragakis, N.J.; Rothstein, J.D. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. **Neurobiol Dis**. v.15, p. 461-473, 2004.

Mantovani, M.; Pértile, R.; Calixto, J.B.; Santos, A.R.; Rodrigues, A.L. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosci Lett**. v.29, p.1-4, 2003.

Maron, D.J.; Fazio, S.; Linton, M.F. Current perspectives on statins. **Circulation**. v.101, p. 207–213, 2000.

Martinowich, K.; Manji, H.; Lu, B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. **Nature Neurosci**. v.10, p.1089-1093, 2007.

Matsumoto, T.; Numakawa, T.; Yokomaku, D.; Adachi, N.; Yamagishi, S.; Numakawa, Y. Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of glutamate and GABA release: different dependency on signaling pathways and neuronal activity. **Mol Cell Neurosci**. v. 31, p.70–84, 2006.

Mauri, M. C.; Ferrara, A.; Boscati, L.; Bravin, S.; Zamberlan, F.; Alecci, M.; Invernizzi, G. Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. **Neuropsychobiology**. v.37, p.124–129, 1998.

McIntyre, R.S.; Fallu, A.; Konarski, J. Z. Measurable outcomes in psychiatric disorders: remission as a marker of wellness. **Clin Ther**, v.28, p. 1882-1891, 2006.

McTaggart, F.; Buckett, L.; Davidson, R.; Holdgate, G.; McCormick, A.; Schneck, D.; Smith, G.; Warwick M. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. **Am. J. Cardiol**. v.87, (Suppl. B), p.28–32, 2001.

Meador-Woodruff, J.H.; Hogg, A.J. Jr.; Smith, R.E. Striatal ionotropic glutamate receptor expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. **Brain Res Bull**. v.55, p.631-640, 2001.

Meldrum, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**. v.130, p. 1007-1015, 2000.

Michael-Titus, A.T.; Bains, S.; Jeetle, J.; Whelpton, R. Imipramine and phenelzine decrease glutamate overflow in the prefrontal cortex--a possible mechanism of neuroprotection in major depression? **Neuroscience**, v.100, p.681-684, 2000.

Miguel-Hidalgo, J.J.; Waltzer, R.; Whittom, A.A.; Austin, M.C.; Rajkowska, G.; Stockmeier, C.A. Glial and glutamatergic markers in depression, alcoholism, and their comorbidity. **J Affect Disord.** v.127, p.230-240, 2010.

Miida, T.; Takahashi, A.; Ikeuchi, T. Prevention of stroke and dementia by statin therapy: experimental and clinical evidence of their pleiotropic effects. **Pharmacol Ther.** v.113, p. 378-393, 2007.

Moghadasian, M.H. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **Life Sci.** v.65, p.1329-1337, 1999.

Moghaddam, B.; Javitt, D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. **Neuropsychopharmacology.** V.37, p.4-15, 2012.

Molz, S.; Decker, H.; Oliveira, I.J.; Souza, D.O.; Tasca, C.I. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. **Neurochem Res.** v.30, p.83-89, 2005.

Molz, S.; Decker, H.; Dal-Cim, T.; Cremonez, C.; Cordova, F.M.; Leal, R.B.; Tasca, C.I. Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. **Neurochem Res.** v.33, p.27-36, 2008.

Molz, S.; Dal-Cim, T.; Tasca, C.I. Guanosine-5'-monophosphate induces cell death in rat hippocampal slices via ionotropic glutamate receptors activation and glutamate uptake inhibition. **Neurochem Int.** v.55, p.703-709, 2009.

Monteggia, L.M.; Barrot, M.; Powell, C.M.; Berton, O.; Galanis, V.; Gemelli, T.; Meuth, S.; Nagy, A.; Greene, R.W.; Nestler, E.J. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.29, p.10827–10832, 2004.

Moretti, M., Freitas, A. E. de, Budni, J., Fernandes, S.C.P., Balen, G.O., Rodrigues, A.L.S. Involvement of nitric oxide–cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. **Behavioural Brain Research,** v.225, p.328– 333, 2011.

Murray, C. J.; Lopez, A. D. Evidence-based health policy — lessons from the Global Burden of Disease Study. **Science**. v.274, p.740–743, 1996.

Musazzi, L.; Milanese, M.; Farisello, P.; Zappettini, S.; Tardito, D.; Barbiero, V.S.; Bonifacino, T.; Mallei, A.; Baldelli, P.; Racagni, G.; Raiteri, M.; Benfenati, F.; Bonanno, G.; Popoli, M. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. **PLoS One**. v.5, p.1-11, 2010.

Naylor, G.J.; Smith, A.H.; Conelly, P. A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. **Biol Psychiatry**. v.22, p.657-659, 1987.

Nichols, R.A.; Dengler, A.F.; Nakagawa, E.M.; Bashkin, M.; Paul, B.T.; Wu, J.; Khan, G.M. A constitutive, transient receptor potential-like Ca^{2+} influx pathway in presynaptic nerve endings independent of voltage-gated Ca^{2+} channels and $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange. **J Biol Chem**. v.49, p.36102-36111, 2007.

Nudmamud-Thanoi, S.; Reynolds, G.P. The NR1 subunit of the glutamate/NMDA receptor in the superior temporal cortex in schizophrenia and affective disorders. **Neurosci Lett**. v.30, p.173-177, 2004.

Olney, J.W. Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. **Biol Psychiatry**. v.26, p.505-525, 1989.

Ordway, G.A.; Farley, J.T.; Dilley, G.E.; Overholser, J.C.; Meltzer, H.Y.; Balraj, E.K.; Stockmeier, C.A.; Klimek, V. Quantitative distribution of monoamine oxidase A in brainstem monoamine nuclei is normal in major depression. **Brain Res**. v.13, p.71-79, 1999.

Ossowska, G.; Klenk-Majewska, B.; Szymczyk, G. The effect of NMDA antagonists on footshock-induced fighting behavior in chronically stressed rats. **J Physiol Pharmacol**. v.48, p.127-135, 1997.

Ottersen, O. P.; Zhang, N.; Walberg, F. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. **Neuroscience**, v.46, p.519–534, 1992.

Ozawa, S.; Kamiya, H.; Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progr. Neurobiol.** v.55, p.581-618, 1998.

Panconi, E.; Roux, J.; Altenbaumer, M.; Hampe, S.; Porsolt, R.D. MK-801 and enantiomers: potential antidepressants or false positives in classical screening models? **Pharmacol Biochem Behav.** v.46, p.15-20, 1993.

Pannu, R.; Christie, D.K.; Barobosa, E.; Singh, I.; Singh, A.K. Post trauma lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. **Journal of Neurochemistry.** v.101, p.182-200, 2007.

Paul, I.A.; Layer, R.T.; Skolnick, P.; Nowak, G. Adaptation of the NMDA receptor in rat cortex following chronic electroconvulsive shock or imipramine. **Eur J Pharmacol.** v.15, p.305-311, 1993.

Paul, I. A.; Skolnick, P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.1003, p.250–272, 2003.

Pessoa, L. On the relationship between emotion and cognition. **Nat. Rev. Neurosc.** v.9, p.148-158, 2008.

Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem.** v.83, p.346-356, 1977.

Picchini, A.M.; Manji, H.K.; Gould, T.D. GSK-3 and neurotrophic signaling: novel targets underlying the pathophysiology and treatment of mood disorders? **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.** v.1, p.419-428, 2004.

Piermartiri, T. C. B.; Figueiredo, C. P.; Rial, D.; Duarte, F. S.; Bezerra, S. C.; Mancini, G.; De Bem, A. F.; Prediger, R. D. S.; Tasca, C. I. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β 1-40 administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. **Experimental Neurology**, v.226, p.274-284, 2010.

Piermartiri, T. C. B.; Vandresen_Filho, S.; Herculano, B. A.; Martins, W. C.; Dal'Agnolo, D.; Stroeck, E.; Carqueja, C. L.; Boeck, C. R.; Tasca, C.I. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt – phosphorylation and glutamate uptake. **Neurotox. Res.** v.16, p.106-115, 2009.

Pin, J. P.; Duvoisin, R. Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacol.**, v.34, p.1-26, 1995.

Phillis, J.W.; O'regan, M.H. Energy utilization in the ischemic/reperfused brain. **Int Rev Neurobiol.** v.51, p.377-414, 2002.

Ponce, J.; de la Ossa, N.P.; Hurtado, O.; Millan, M.; Arenillas, J.F.; Dávalos, A.; Gasull, T. Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. **Stroke.** v.39, p.1269-1275, 2008.

Porsolt, R.D.; Bertin, A.; Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn.** v. 229, 327–336, 1977.

Prince, M.; Patel, V.; Saxena, S.; Maj M.; Maselko, J.; Phillipi, M. R.; Rahman, A. No health without mental health. **Lancet.** v.370, p.859-877, 2007.

Racagni, G.; Popoli, M. Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. **Dialogues Clin Neurosci.** v.10, p. 385-400, 2008.

Rader, D. J. Therapy to reduce the risk of coronary heart disease. **Clin. Cardiol.** v.26, p.2–8, 2003.

Radi, R.; Beckman, J.S.; Bush, K.M.; Freeman, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch Biochem Biophys.** v.1, p. 481-487, 1991 (a).

Radi, R.; Turrens, J.F.; Freeman, B.A. Cytochrome c-catalyzed membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide. **Arch Biochem Biophys.** v.1, p.118-125, 1991 (b).

Rangel, P.; Cysneiros, R.M.; Arida, R.M.; de Albuquerque M.; Colugnati, D.B.; Scorza, C.A.; Cavalheiro, E.A.; Scorza, F.A. Lovastatin reduces neuronal cell death in hippocampal CA1 subfield after pilocarpine-induced status epilepticus. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 63, p. 972-976, 2005.

Reiersen, G.W.; Mastronardi, C.A.; Licinio, J.; Wong, M.L. Repeated antidepressant therapy increases cyclic GMP signaling in rat hippocampus. **Neurosci Lett.** v.466, p.149-153, 2009.

Rodrigues, A.L.; Rocha, J.B.; Mello, C.F.; Souza, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol.** v.79, p.150-156, 1996.

Rogóz, Z.; Skuza, G.; Maj, J.; Danysz, W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. **Neuropsychopharmacology**, v.42, p.1024-1030, 2002.

Rosa, A.O.; Lin, J.; Calixto, J.B.; Santos, A.R.; Rodrigues, A.L. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. **Behav Brain Res.** v.15, p.87-93, 2003.

Ryter, S.W.; Kim, H.P.; Hoetzel, A.; Park, J.W.; Nakahira, K.; Wang, X.; Choi, A.M. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxid Redox Signal.** v.9, p.49-89, 2007

Sairanen, M.; O'Leary, O.F.; Knuuttila, J.E.; Castren, E. Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. **Neuroscience**, v.144, p.368-374, 2007.

Sanacora, G.; Kendell, S.F.; Fenton, L.; Coric, V.; Krystal, J.H. Riluzole augmentation for treatment-resistant depression. **Am J Psychiatry**. v.161, 2132, 2004.

Sanacora, G., Zarate, C.A., Krystal, J.H., Manji, H.K.. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature Rev Drug Disc**. v.7, p.426–437, 2008.

Sanacora, G.; Treccani, G. Popoli, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**. v.62, p.63-77, 2012.

Sattler, R.; Xiong, Z.; Lu, W.Y.; Hafner, M.; MacDonald, J.F.; Tymianski, M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. **Science**, v.11, p.1845-1848, 1999.

Schachter, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundam Clin Pharmacol**. v.19, p.117-125, 2004.

Schildkraut, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**. v.122, p. 509-522, 1965.

Schwartz, G.G.; Olsson, A.G.; Ezekowitz, M.D.; Ganz, P.; Oliver, M.F.; Waters, D.; Zeiher, A.; Chaitman, B.R.; Leslie, S.; Stem, T.; for the Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes. The MIRACL study: a randomized controlled trial. **JAMA**. v.285, p.1711–1718, 2001.

Shaltiel, G.; Chen, G.; Manji H.K. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. **Curr Opin Pharmacol**. v.7, p.22-26, 2007.

Shepardson, N.E.; Shankar, G.M.; Selkoe, D.J. Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies. **Arch Neurol**. v.68, p.1239-1244, 2011.

Shirayama, Y.; Chen, A.C.; Nakagawa, S.; Russell, D.S.; Duman, R.S. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **J Neurosci.** v.22, p.3251–3261, 2002.

Siegel, G. J.; Albers, R.W.; Brady, S.T.; Price, D.L. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects.** 7th ed., Elsevier Academic Press: Burlington, 2006.

Sparks, D.L. Alzheimer disease: Statins in the treatment of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol.** v.12, p.662–663, 2011.

Stein, E.A. Management of dyslipidemia in the high-risk patient. **Am Heart J.** v.144, (6 Suppl), p.S43–50, 2002.

Steru, L.; Chermat, R.; Thiery, B.; Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology.** v.85, p.367–370, 1985.

Stone, T.W.; Addae, J.I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **Eur J Pharmacol.** v.447, p.285–296, 2002.

Szydlowska, K.; Tymianski, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. **Cell Calcium.** v.47, 122–129, 2010.

Takamori, S. VGLUTs: ‘exciting’ times for glutamatergic research? **Neurosci Res.** v.55, p.343–351, 2006.

Tsai, S.J. Statins may enhance the proteolytic cleavage of proBDNF: Implications for the treatment of depression. **Medical Hypotheses,** v.68, p.1296–1299, 2007.

Tsankova, N.; Renthal, W.; Kumar, A.; Nestler, E. J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nat Rev Neurosci.** v.8, p.355–367, 2007

Trivedi, M.H.; Fava, M.; Wisniewski, S.R.; Thase, M.E.; Quitkin, F.; Warden, D.; Ritz, L.; Nierenberg, A.A.; Lebowitz, B.D.; Biggs, M.M.; Luther, J.F.; Shores-Wilson, K.; Rush, A.J.; Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. **N Engl J Med.** v.23, p.1243–1252, 2006.

Tymianski, M. Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. **Nat Neurosci.** v.11, p.1369-1373, 2011.

Valentine, G.W.; Mason, G.F.; Gomez, R.; Fasula, M.; Watzl, J.; Pittman, B.; Krystal, J.H.; Sanacora, G. The antidepressant effect of ketamine is not associated with changes in occipital amino acid neurotransmitter content as measured by [(1)H]-MRS. **Psychiatry Res.** v.28, p.122-127, 2011.

Van Aelst, L.; D'Souza-Schorey, C. Rho GTPases and signaling networks. **Genes Dev.** v.11, p.2295-2322, 1997.

Vaughan, F.L.; Hughes, E.A.; Jones, R.S.; Woods, R.T.; Tipper, S.P. Spatial negative priming in early Alzheimer's disease: evidence for reduced cognitive inhibition. **J Int Neuropsychol Soc.** v.12, p.416-423, 2006.

Wang, X.; Wu, J.; Xiao, H.; Shi, Y. Effects of fenvalerate and phoxim insecticides on glutamate and gamma-aminobutyric acid immunoreactive cells in the central nervous system of rats. **Wei Sheng Yan Jiu.** v.30, p.1-3, 2000.

Warner, M.A.; Neill, K.H.; Nadler, J.V.; Crain, B.J. Regionally selective effects of NMDA receptor antagonists against ischemic brain damage in the gerbil. **J Cereb Blood Flow Metab.** v.4, p.600-610, 1991.

Wu, K.; Xu, J.L.; Suen, P.C.; Levine, E.; Huang, Y.Y.; Mount, H.T.; Lin, S.Y.; Black, I.B. Functional trkB neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density. **Brain Res Mol Brain Res.** v.43, p. 286-290, 1996.

Wu, H.; Lu, D.; Jiang, H.; Xiong, Y.; Qu, C.; Li, B.; Mahmood, A.; Zhou, D.; Chopp, M. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. **J. Neurotrauma.** v.25, p.130-139, 2008.

Yilmaz, N.; Demirdas, A.; Yilmaz, M.; Sutcu, R.; Kirbas, A.; Cure, M.C.; Eren, I. Effects of venlafaxine and escitalopram treatments on NMDA receptors in the rat depression model. **J Membr Biol.** v.242, p.145-151, 2011.

Yoshida, M. Potential role of statins in inflammation and atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb.** v.10, p.140–144, 2003.

Young-Xu, Y.; Chan, K.A.; Liao, J.K.; Ravid, S.; Blatt, C.M. Long-term statin use and psychological well-being. **J Am Coll Cardiol.** v.20, p.690-697, 2003.

Zacco, A.; Togo, J.; Spence, K.; Ellis, A.; Lloyd, D.; Furlong, S.; Piser, T. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Protect Cortical Neurons from Excitotoxicity. **The Journal of Neuroscience,** v.35, p.11104–11111, 2003.

Zarate, C.A. Jr.; Payne, J.L.; Quiroz, J.; Sporn, J.; Denicoff, K.K.; Luckenbaugh, D.; Charney, D.S.; Manji, H.K. An open-label trial of riluzole in patients with treatment resistant major depression. **Am J Psychiatry.** v.161, p.171-174, 2004.

Zeni, A.L., Zomkowski, A.D., Dal-Cim, T., Maraschin, M., Rodrigues, A.L., Tasca, C.I. Antidepressant-like and neuroprotective effects of Aloysia gratissima: investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **J Ethnopharmacol.** v.137, p.864-874, 2011.

Zhou, X.F.; Song, X.Y.; Zhong, J.H.; Barati, S.; Zhou, F.H.; Johnson, S.M. Distribution and localization of pro-brain-derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in the peripheral and central nervous system of the adult rat. **J Neurochem.** v. 91, p. 704–715, 2004.

Zhu, X.J.; Hua, Y.; Jiang, J.; Zhou, Q.G.; Luo, C.X.; Han, X.; Lu, Y.M.; Zhu, D.Y. Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the adult dentate gyrus by down-regulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation. **Neuroscience,** v.141, p.827-836, 2006.

Zomkowski, A.D; Santos, A.R.; Rodrigues, A.L. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. **Neurosci Lett.** v.24, p.279-283, 2005.

Zomkowski, A.D.E.; Engel, D.; Gabilan, N.H.; Rodrigues, A.L.S.
Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic
guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of
escitalopram in the forced swimming test. **European Neurophys.** v.20,
p.793-801, 2010.

